

**INFLUENCIA DE LA ÁCIDEZ VOLÁTIL EN EL PROCESO DE
FERMENTACIÓN DE LA PLANTA DE ALCOHOL DEL INGENIO
RISARALDA S.A.**

**CLARITA MILENA GALLEGU GIL
CÓDIGO 42.029.525**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA
AÑO 2007**

**INFLUENCIA DE LA ÁCIDEZ VOLÁTIL EN EL PROCESO DE
FERMENTACIÓN DE LA PLANTA DE ALCOHOL DEL INGENIO
RISARALDA S.A.**

**CLARITA MILENA GALLEGU GIL
CÓDIGO 42.029.525**

**Trabajo de Grado
Requisito parcial para optar el título de Químico Industrial**

**Director
Carlos Humberto Montoya Navarrete
Químico Industrial**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA
AÑO 2007**

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE AZÚCAR	5
3.2 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOL	7
3.3 PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN PLANTAS AZUCARERAS	7
3.4 MICROBIOLOGÍA DE LA LEVADURA	9
3.4.1 Metabolismo aeróbico	10
3.4.2 Metabolismo anaeróbico	11
3.4.3 Población y Viabilidad	12
3.4.4 Cinética de crecimiento	12
3.4.4.1 Fase latente	13
3.4.4.2 Fase de crecimiento	13
3.4.4.3 Fase estacionaria	14
3.5 PROCESO DE FERMENTACIÓN	15
3.6 FACTORES QUE AFECTAN LA LEVADURA EN LA FERMENTACIÓN	15
3.6.1 Materia prima	16

	Pág.
3.6.2 Almacenamiento de la materia prima	17
3.6.3 Azucares fermentables	17
3.6.4 Contenido total de materia orgánica	17
3.6.5 Contenido total de materia inorgánica y cenizas	18
3.6.6 Contenido de sólidos sedimentables	18
3.6.7 pH	18
3.6.8 Temperatura	18
3.6.9 Acidez volátil orgánica	18
3.6.10 Contenido de caramelos	19
3.6.11 Contenido de bacterias	19
3.6.12 Sodio	19
3.6.13 Relación carbono/Nitrógeno	19
3.6.14 Contenido celular	19
3.6.15 Tiempo de residencia	19
3.6.16 Agitación en el fermentador	20
3.6.17 Concentración de etanol	20
3.7 FERMENTACIÓN CONTINUA CON RECIRCULACIÓN DE LEVADURA	20
3.8 ETAPA DE PROPAGACIÓN	20
3.9 ETAPA DE FERMENTACIÓN	23
3.10 RECIRCULACIÓN DE LEVADURA	24
3.11 RECIRCULACIÓN DE VINAZA	26
3.12 TIPO DE CONTAMINANTES EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	26

	Pág.
3.12.1 Bacterias lácticas	27
3.12.2 Fermentación ácido láctica	27
3.12.3 Bacterias acéticas	28
3.13 IDENTIFICACIÓN MICROBIANA	29
4. MARCO DE REFERENCIA	31
4.1 MARCO GEOGRÁFICO	31
4.2 TIPO DE ESTUDIO	32
4.3 ANTECEDENTES	32
5. METODOLOGÍA	33
5.1 PUNTOS DE MUESTREO	33
5.2 TOMA DE MUESTRAS	34
5.2.1 Análisis Fisicoquímicos y Cromatográficos	34
5.2.2 Análisis Microbiológicos	37
5.3 MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS	37
5.3.1 Equipos	37
5.3.2 Material de vidrio	39
5.3.3 Reactivos	39
5.3.4 Gases	40
5.3.5 Medios de cultivo	40
5.3.6 Otros implementos de laboratorio	40
5.3.7 Equipos de protección personal	41
5.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS	41
5.4.1 Acidez volátil titulable en mieles y mosto fermentado en términos de ácido acético y sales de acetato	41

	Pág.
5.4.2 Determinación del porcentaje de alcohol en el mosto fermentado usando densímetro	43
5.4.3 Determinación y cuantificación de ácidos volátiles en mieles y mosto fermentado por cromatografía de gases	43
5.4.3.1 Tratamiento de la muestra	43
5.4.3.2 Condiciones Cromatográficas	45
5.4.3.3 Curvas de calibración	45
5.4.4 Análisis Microbiológicos	46
6. DATOS, RESULTADOS Y DISCUSION	48
6.1 ACIDEZ VOLÁTIL TITULABLE EN MIELES Y MOSTO FERMENTADO EN TÉRMINOS DE ÁCIDO ACÉTICO O SALES DE ACETATO	48
6.1.1 Tanque de alimentación (T-124)	48
6.1.2 Fermentadores R-311 y R-312	50
6.1.3 Tanque activación de Levadura R-305	51
6.1.4 Vinaza recirculada T-403	53
6.2 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	55
6.2.1 Condiciones cromatográficas óptimas	55
6.2.2 Identificación	57
6.2.3 Curva de calibración	58
6.2.4 Cuantificación de los ácidos volátiles en el proceso de fermentación	61
6.2.4.1 Tanque de alimentación (T-124)	61
6.2.4.2 Fermentador R-311	63
6.2.4.3 Fermentador R-312	65

	Pág.
6.2.4.4 Tanque de Activación de levadura R-305	67
6.2.4.5 Vinaza Recirculada T-403	69
6.2.5 Análisis Microbiológicos	71
7. CONCLUSIONES	76
8. RECOMENDACIONES	77
9. BIBLIOGRAFIA	78

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Calidad del jugo de caña	6
Tabla 2. Suelo y cultivo	8
Tabla 3. Prácticas de cultivo	8
Tabla 4. Proceso de elaboración	8
Tabla 5. Almacenamiento y manejo de mieles	8
Tabla 6. Aspectos positivos de la melaza da caña	9
Tabla 7. Aspectos negativos de la melaza de caña	9
Tabla 8. Parámetros a tener en cuenta en la fermentación	16
Tabla 9. Características de la materia prima	21
Tabla 10. Factores de recuperación del equipo de destilación utilizado	43
Tabla 11. Condiciones cromatográficas empleadas	45
Tabla 12. Patrones de ácidos volátiles	45
Tabla 13. Resultados de la Acidez Volátil en la materia prima	48
Tabla 14. Resultados de la acidez volátil versus porcentaje de alcohol en el mosto fermentado	51
Tabla 15. Resultados de la acidez volátil de tanque de activación de Levadura a diferentes pH	52
Tabla 16. Resultados de la Acidez volátil y porcentaje de recirculación de vinaza	54
Tabla 17. Tiempos de retención de los ácidos orgánicos por cromatografía de gases	57
Tabla 18. Concentración de cada ácido volátil en la materia prima comparado con la acidez total por titulación	62
Tabla 19. Concentración de cada ácido volátil en el fermentador R311	64
Tabla 20. Concentración de cada ácido volátil en el fermentador R312	66
Tabla 21. Concentración de cada ácido volátil en el tanque R-305	68
Taba 22. Concentración de cada ácido volátil en la vinaza recirculada del tanque T-403	70
Tabla 23. Recuento en placa de bacterias mesófilas y lácticas en el proceso de fermentación	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama general del proceso de producción de azúcar	6
Figura 2. Diagrama esquemático para la producción de alcohol	7
Figura 3. Reproducción de la levadura vista al microscopio electrónico	10
Figura 4. Metabolismo aeróbico (Respiración)	11
Figura 5. Metabolismo anaeróbico (Fermentación)	12
Figura 6. Cinética de crecimiento de la levadura	13
Figura 7. Esquema de propagación de levadura	22
Figura 8. Fotografía cubas de propagación de la planta de alcohol del Ingenio Risaralda	23
Figura 9. Fotografía de los fermentadores de la planta de alcohol del Ingenio Risaralda	23
Figura 10. Fotografía del sedimentador de la planta de alcohol del Ingenio Risaralda	24
Figura 11. Esquema de recirculación de levadura	25
Figura 12. Fotografía del Sistema de recirculación de levadura de la planta de alcohol de Ingenio Risaralda	25
Figura 13. Esquema de recirculación de vinaza	26
Figura 14. Fermentación ácido láctica	28
Figura 15. Reacciones metabólicas por bacterias	30
Figura 16. Vista superior de la maqueta del ingenio Risaralda S.A.	31
Figura 17. Esquema General de fermentación	33
Figura 18. Fotografía al tanque de alimentación T-124	34
Figura 19. Punto de muestreo Fermentador R-311	35
Figura 20. Punto de Muestreo Tanque R-305	35
Figura 21. Punto de muestreo Tanque T-335	36
Figura 22. Punto de muestreo tanque de vinaza T-403	36
Figura 23. Alcotest	37
Figura 24. Cromatógrafo de gases	38
Figura 25. Densímetro DMA 4500	38
Figura 26. Titulador Automático Methrom	39
Figura 27. Diagrama del procedimiento para determinar la acidez volátil titulable en mieles y mosto fermentado	41
Figura 28. Diagrama para determinar el factor de recuperación del equipo de destilación por arrastre de vapor	42
Figura 29. Diagrama para determinar el porcentaje en volumen de alcohol en el mosto fermentado utilizando densímetro	43

	Pág.
Figura 30. Diagrama Recuento de bacterias por placa	46
Figura 31. Cromatograma de un estándar con los seis ácidos en etanol	55
Figura 32. Cromatograma de una muestra problema diluida en etanol	56
Figura 33. Cromatograma de un estándar con los seis ácidos en Diclorometano	57
Figura 34. Curvas de Calibración de los ácidos en estudio	58
Figura 35. Cromatograma de una muestra en estudio de T-124	61
Figura 36. Cromatograma de una muestra en estudio del fermentador R-311	63
Figura 37. Cromatograma de una muestra en estudio del fermentador R-312	65
Figura 38. Cromatograma de una muestra en estudio del tanque R-305	67
Figura 39. Cromatograma de una muestra en estudio de la vinaza recirculada	69

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Curva de control acidez volátil en la materia prima	49
Gráfico 2. Curvas de control acidez volátil en los fermentadores 1 y 2	50
Gráfico 3. Curva de control acidez volátil en el tanque de activación de levadura	53
Gráfico 4. Comportamiento de la AVT en la vinaza recirculada en el proceso de fermentación	54
Gráfico 5. Comportamiento de cada ácido volátil en la materia prima durante el tiempo de desarrollo del cultivo	62
Gráfico 6. Comportamiento de cada ácido volátil en el fermentador R-311 durante el tiempo de desarrollo de cultivo	64
Gráfico 7. Comportamiento de cada ácido volátil en el fermentador R-312 durante el tiempo de desarrollo de cultivo	66
Gráfico 8. Comportamiento de cada ácido volátil en el tanque R-305 durante el tiempo de desarrollo de cultivo	68
Gráfico 9. Comportamiento de cada ácido volátil de la vinaza recirculada durante el tiempo de desarrollo de cultivo	70
Gráfico 10. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en la materia prima (T-124)	72
Gráfico 11. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en el tanque de activación de levadura	73
Gráfico 12. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en el fermentador R-311	73
Gráfico 13. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en el fermentador R-312	74
Gráfico 14. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en la vinaza recirculada (T-403)	74

INTRODUCCION

Por el año 1925, Henry Ford predijo: “El combustible del futuro derivará de los productos agrícolas”. Consistentemente con esta predicción, en 1927, el primer Ford A venía equipado de fábrica con un carburador de regulación manual para dar al comprador del vehículo la posibilidad de usarlo con gasolina o alcohol. (3)

Llegando a la actualidad, el resurgimiento del alcohol como combustible es una posible solución para el problema que atraviesan varios países que no logran cubrir el 100% de sus necesidades de petróleo, debiendo importar el mismo a altos precios. Este alto costo surgió debido a la llamada crisis de Oriente, en la cual los países más ricos en petróleo elevaron el precio del mismo en forma substancial. Una razón más para adicionar alcohol carburante al combustible es la protección del medio ambiente debido a que se disminuye la generación de monóxido de carbono (CO) y de hidrocarburos (HC) ya que se aumenta la eficiencia de combustión al presentarse una mejor relación aire-combustible. (9)

Colombia es un país agrícola que puede producir alcohol de varias fuentes (melaza de caña de azúcar, granos, vinos, etc.) en cantidades importantes. La principal ventaja de este combustible radica en que se trata de un recurso renovable, no como los hidrocarburos que representan una riqueza única y agotable. (9)

El Ingenio Risaralda S.A. estuvo entre los cinco primeros ingenios de Colombia en construir la planta de alcohol carburante a partir de la caña de azúcar. La construcción se inició en enero del 2005 y entró en operación el 28 de enero de 2006 alcanzando una producción de 16.389.235 litros ese año, de los cuales el 98.3% fueron de alcohol carburante y el 1.7% de otros alcoholes para uso industrial.

La producción de alcohol a partir de mieles o meladura se fundamenta en una etapa de reacción bioquímica (fermentación), una primera etapa de extracción de alcohol (destilación), una segunda etapa de separación en la que se obtiene alcohol absoluto (deshidratación) y finalmente una etapa de tratamiento de efluentes (compostaje). (1)

La Fermentación es una de las etapas iniciales más importantes en el proceso de producción de alcohol que consiste en la transformación de los azúcares fermentables de la mezcla jugo-miel en alcohol y CO₂ por medio de reacciones bioquímicas usando un tipo especial de levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*). El material resultante se denomina vino y contiene cerca del 8 al 10% (v/v) de alcohol. (1)

Existen varios factores que afectan el proceso de fermentación entre ellos está la acidez volátil la cual es un factor determinante en la producción de alcohol carburante ya que las levaduras *Sacharomyces cerevisiae* se ven afectadas

cuando los niveles de acidez volátil superan los rangos de tolerancia, 3000ppm aproximadamente, esto conlleva a bajos rendimientos, aparición de otros compuestos e incluso a la inactivación de la levadura. (1)

En el proceso de obtención de alcohol el Ingenio Risaralda S.A pretende recircular parte de la vinaza producida en la destilación, lo cual genera incremento de la acidez volátil haciendo más crítico el control de la misma.

En el presente trabajo la acidez volátil se determina en forma total por destilación en medio ácido y/o cuantitativamente y con precisión utilizando cromatografía de gases y con dichos resultados se pretende conocer la influencia que tiene sobre el proceso de fermentación de la planta de alcohol.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de la acidez volátil en el proceso de fermentación de la planta de alcohol del Ingenio Risaralda S.A.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar la concentración de ácidos volátiles titulables en términos de ácido acético presentes en la materia prima y en cuatro puntos críticos del proceso de fermentación alcohólica utilizando procedimientos de destilación por arrastre de vapor.
- ❖ Cuantificar los ácidos volátiles presentes en el proceso de fermentación en cinco puntos críticos utilizando cromatografía de gases.
- ❖ Identificar cuál de los ácidos volátiles es el que se produce en mayor cantidad.
- ❖ Identificar la población microbiana empleando recuentos en placa y pruebas comunes de microbiología.

2. JUSTIFICACIÓN

La producción de alcohol etílico en el Ingenio Risaralda S.A. se realiza mediante la fermentación de materias primas ricas en azúcares. Esta fermentación es provocada por la levadura *Sacharomyces cerevisiae* y puede ser desfavorable si entran en acción bacterias que desvían la marcha de las reacciones, produciendo ácidos volátiles y otros productos que son perjudiciales en el proceso y en la calidad del alcohol.

La acidez volátil genera incrementos de la presión osmótica que estresan e inhiben la actividad de la levadura y hasta causan su muerte. Por tal razón los microorganismos utilizan los azúcares para la producción de ácidos de bajo peso molecular tales como acético, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, propiónico, etc. Estos reducen la eficiencia de fermentación y la producción del etanol. Un incremento en la acidez volátil es un indicador de la presencia de bacterias ácido lácticas en la fermentación (1).

Es inevitable la presencia de ácidos volátiles ya que estos están presentes desde el cultivo de la caña de azúcar y van aumentado en los períodos de permanencia de la caña en patios y durante el proceso de elaboración. Esto es debido a que los materiales contienen gran cantidad de azúcar disponible y el azúcar es una necesidad básica para la vida microbiológica. Los microbios provenientes del aire, las tuberías, los tanques de almacenamiento o el suelo entran y se desarrollan en el material. Los valores recomendados para este parámetro, sin que afecte notablemente la actividad de la levadura están entre 3000 ppm y 5000 ppm. (1)

Es así como el conocimiento de la concentración de ácidos volátiles en la materia prima y durante el proceso de fermentación es algo muy importante ya que es una medida indirecta de la contaminación que está entrando o se está generando en el proceso, incrementando el tiempo de fermentación y disminuyendo la eficiencia total de la planta. Se puede determinar en forma total por destilación en medio ácido y/o individualmente y con precisión utilizando cromatografía de gases. (1)

Además controlar esta variable en todo el proceso nos garantiza la calidad del producto final y cumplir con ciertas especificaciones dadas por la legislación colombiana. (7)

3. MARCO TEORICO

3.1 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE AZÚCAR (1)

De manera breve se tratará el esquema de producción de azúcar a partir de la caña. Normalmente, el jugo es extraído de la caña a través de procesos de molienda empleando metodologías tradicionales de imbibición. Esta técnica consiste en moler la caña aplicando simultáneamente agua a una temperatura entre 70-75 °C con el propósito de facilitar la extracción. Los jugos extraídos (jugo primario y jugo secundario) son mezclados y enviados a la sección de elaboración. Una composición representativa de jugo de caña puede observarse en la tabla 1.

El jugo resultante (jugo crudo) se calienta entre 70 a 75 °C para acondicionarlo. Asimismo, el jugo crudo se somete a un tratamiento químico con ácido fosfórico, dióxido de azufre y lechada de cal para remover impurezas y contaminantes indeseados, en una operación de clarificación.

En la clarificación, el jugo crudo se separa en dos corrientes: los fondos sedimentados y el jugo claro. Los fondos sedimentados, que contienen una alta carga de sólidos orgánicos, son tratados en filtros rotatorios al vacío donde se obtiene un subproducto sólido de consistencia pastosa conocido en el lenguaje técnico como cachaza. Usualmente esta cachaza se aprovecha como abono orgánico después de ser sometida a un tratamiento de compostaje. El licor resultante del proceso de filtración se retorna al proceso en la etapa previa de clarificación.

Por su parte, el jugo claro con un contenido de agua cercano a 85%, se concentra por medio de evaporadores de múltiple efecto para producir un jarabe (meladura) con un contenido de agua de 37 al 43%. La meladura se trata nuevamente con SO₂ antes de ser enviada a la estación de cristalización (tachos) para ajustar el pH.

El licor agotado en el primer tacho, es decir, el líquido al que se le han retirado los cristales de azúcar, se envía al segundo y luego al tercer tacho. Estos licores agotados (melazas o mieles) tienen un menor contenido de sacarosa pero altos contenidos de glucosa y fructosa que, aunque no son cristalizables, constituyen la materia prima para la producción de alcohol.

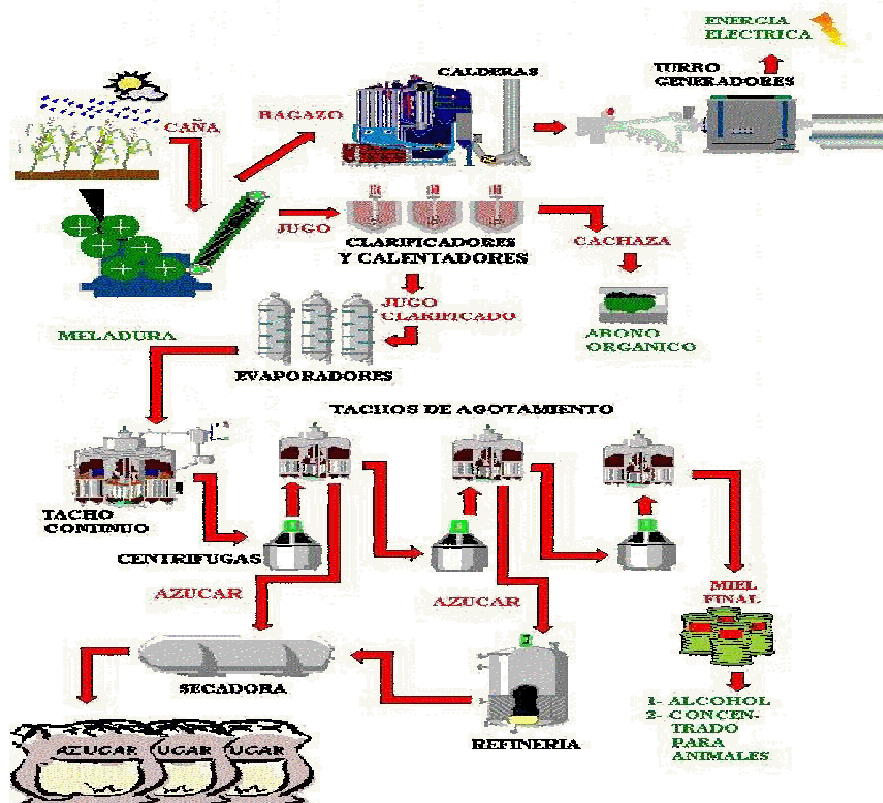
El producto principal obtenido en los tachos (conocido como “masacocida”) se envía a la estación de centrifugas para separar los cristales de azúcar del licor

madre. El licor madre se envía de nuevo a la estación de tachos para su recrystalización. En la figura 1 se esquematiza el proceso.

Tabla 1. Calidad del jugo de caña

Parámetros	Valor
Sólidos Disueltos (%)	14 a 18
Agua (%)	82 a 86
Sacarosa (%)	11 a 14
Azúcares Reductores	0.5 a 1.5
Cenizas (%)	0.5 a 0.7
Purezas (%)	80 a 84
pH	5.0 a 5.4
CaO (mg/L)	600 a 800
P ₂ O ₅ (mg/L)	80 a 150
Color (NTU)	8200 a 8600

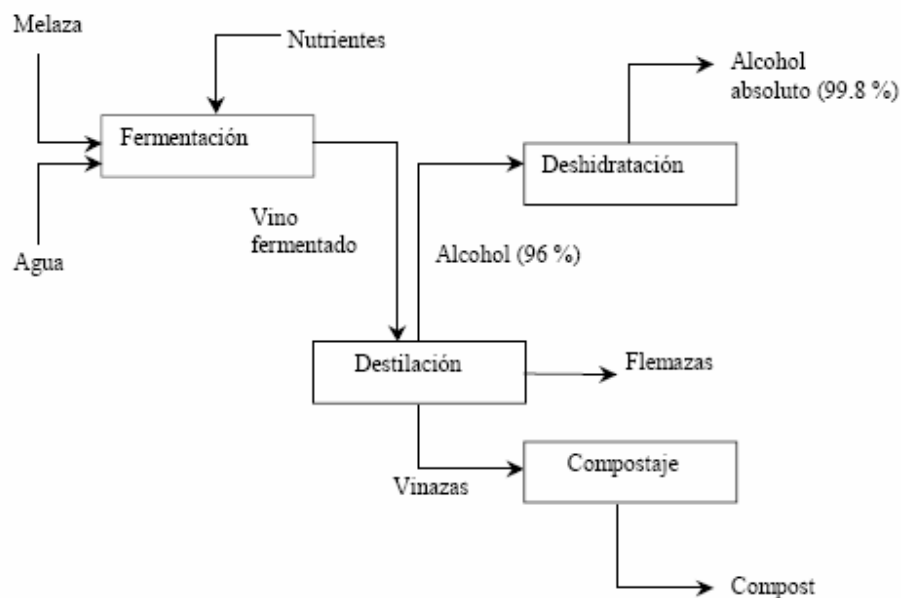
Figura 1. Diagrama general del proceso de producción de azúcar



3.2 PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL ALCOHOL (1)

En términos generales, la producción de alcohol a partir de mieles o meladura se fundamenta en una etapa de reacción bioquímica (fermentación), seguida por una primera etapa de extracción de alcohol (destilación), luego una segunda etapa de separación en la que se obtiene alcohol absoluto (deshidratación) y finalmente una etapa de tratamiento de efluentes (compostaje). Véase figura 2.

Figura 2. Diagrama esquemático para la producción de alcohol



3.3 PRODUCCION DE ALCOHOL EN PLANTAS AZUCARERAS (1)

Las fábricas azucareras que deciden aprovechar las mieles para producir alcohol implementan nuevos esquemas de producción y de operación con el objeto de contextualizar de una forma distinta la planta de producción. En este naciente esquema de producción aparece un nuevo producto (alcohol absoluto) y nuevos efluentes (vinazas, flemazas, lodos, etc.) cuyas características y cantidades producidas dependen en gran medida de la calidad de las mieles obtenidas (véase las tablas siguientes) y, por supuesto, de la operación apropiada del proceso de producción de alcohol. En este contexto, las dos plantas de producción, azúcar y alcohol, deben ser vistas como una sola, una nueva planta que maneja coordinadamente dos productos principales.

Tabla 2. Suelo y cultivo

Características	Efecto	Observación
Composición del suelo y variedad de la caña.	Imparte sólidos inorgánicos y no fermentables, adicionalmente compuestos espumantes que tienen efecto buffer.	Estos elementos son extractados finalmente en las melazas.
Prácticas de fertilización	Imparte N:P:K en las melazas	P, K y ANL(Amino Nitrógeno libre) finalmente terminan en las melazas.
Prácticas y niveles de irrigación	Deciden la composición de jugo y el contenido de agua	Deciden la cantidad y tipo de sólidos en la melaza.

Tabla 3. Prácticas de cultivo

Características	Efecto	Observación
Caña pre y sobre madurada.	Pre madurada altos contenidos de ceras. Sobre madurada altos contenidos de ácidos	Finalmente extractados en la melaza.
Quema de caña	Caramelización de los materiales.	Alto contenido de caramelo en miel final.
Tiempo de permanencia	Composición del jugo y contenido de agua.	Cantidad y tipo de sólidos en la melaza.

Tabla 4. Proceso de elaboración

Acción	Efecto
Extracción y manejo del jugo	El tiempo de retención y la higiene de los equipos permiten crecimiento de bacterias y formación de ácidos.
Clarificación de jugos	El tiempo de retención y la adición de químicos deciden el crecimiento de bacterias y la formación de ácidos.
Proceso de cristalización	Los niveles de temperaturas, tiempos de retención, lavados con vapor y condensados producen caramelización y furfurales.

Tabla 5. Almacenamiento y manejo de mieles

Acción	Efecto
Temperatura de las melazas	Altos niveles de temperatura fomentan la degradación de las melazas y la formación de caramelo.
Prácticas de manejo y almacenamiento	Altos tiempos de almacenamiento, condiciones no higiénicas y diluciones con agua fomentan el crecimiento microbiano y formación de ácidos.

Tabla 6. Aspectos positivos de la melaza de caña

Propiedad	Contenido	Efecto
Azúcares fermentables	37 – 52%	Decide producción de alcohol y costos de materia prima por litro.
Relación Azúcares Fermentables a No Fermentables (F:N)	0.85 – 1.45%	A mayor relación, mayor velocidad de fermentación.
Nitrógeno Fermentable	200 -3000 ppm	Fomenta el crecimiento de la levadura y la producción de alcohol.
Vitaminas naturales (Especialmente complejo B)	Trazas	Vital para el crecimiento de la levadura, su carencia reduce la productividad.
Trazas de nutrientes vitales	Trazas	Vital para las enzimas, fomenta la producción de alcohol.

Tabla 7. Aspectos negativos de la melaza de caña

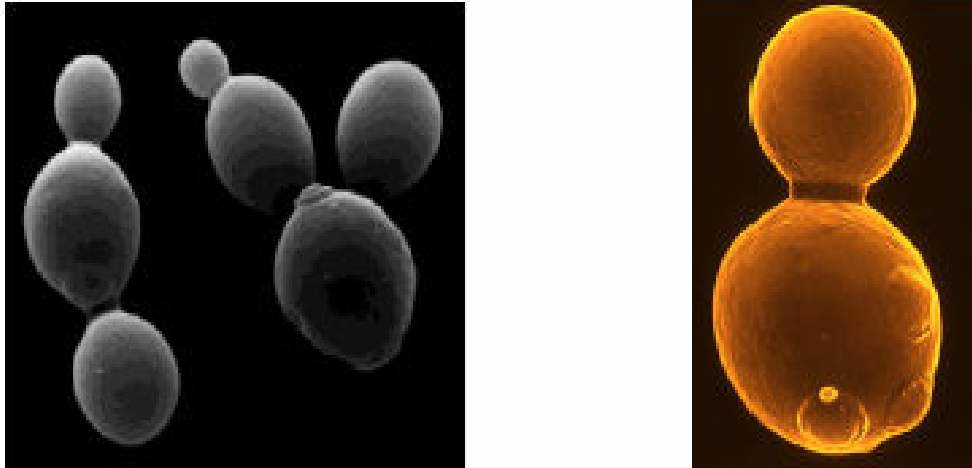
Propiedad	Contenido	Efecto
Sólidos totales	72 – 80%	Afecta la viscosidad y las propiedades de flujo en climas fríos.
Ceniza inorgánica total	7 – 14%	Altos niveles causa toxicidad salina a la levadura
Calcio (como sulfatos)	0.5 – 4%	Genera Incrustación dura y mayores tiempos perdidos para limpieza.
Lodos orgánicos precipitables	1.5 – 4%	Incrementa ahogamiento/puntos muertos que alojan población microbiana.
Capacidad buffer	4.8 – 8.0pH	Si es alta, incrementa los requerimientos de ácido para el proceso.
Capacidad de espumación	Cualitativa	Incrementa al consumo de anti-incrustante para el proceso.
Caramelo (furfural, Hidroximetilfurfural)	0.1 -0.7 O.D	Inhibe la levadura y la producción de alcohol; las eficiencias.
Bacterias y levadura silvestre	100 – 50.000 unid/gr	Inhibe la levadura, produce Acidez Volátil; afecta la fermentación
Acidez volátil	4000 – 15000 ppm	Retarda el crecimiento de la levadura; afecta la productividad de alcohol
Sustancias inhibidoras	Trazas	Biocidas, Zn, Pb

Como se observa, la composición de los materiales de entrada son determinantes para maximizar la producción de alcohol y optimizar los procesos de destilería.

3.4 MICROBIOLOGIA DE LA LEVADURA (9)

La levadura es un microorganismo unicelular y eucariótico, de forma esférica u ovalada y su tamaño varía entre 5 y 10 micras dependiendo de la edad (5 – 10 milésimas de milímetro). La reproducción de la levadura se realiza por vía asexual mediante duplicación celular y el tiempo de reproducción varía entre 2 y 3 horas. Cada célula puede reproducirse entre 4 y 5 veces (véase figura 3).

Figura 3. Reproducción de la levadura vista al microscopio electrónico

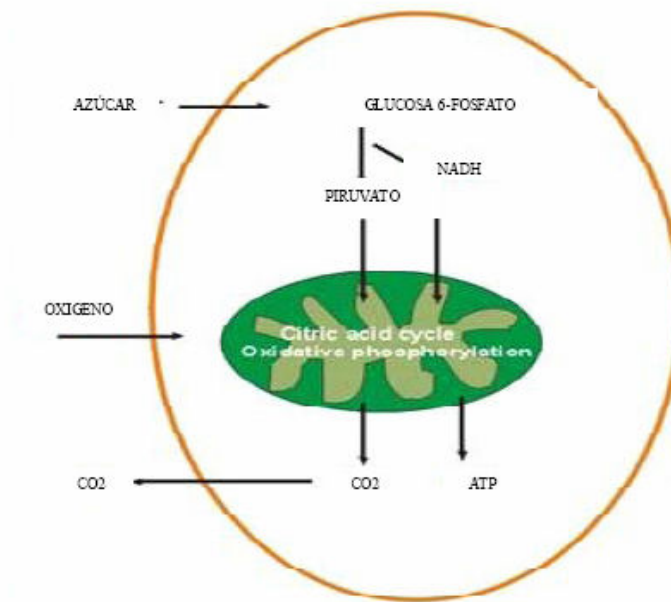


Levadura es el nombre genérico de una categoría de microorganismos entre los que se pueden encontrar hasta 500 clases. En particular, la *Sacharomyces cerevisiae* tiene la propiedad de producir, en un medio rico en carbohidratos y en ausencia de oxígeno, alcohol etílico (C_2H_5OH) y dióxido de carbono (CO_2). Esta levadura requiere como nutrientes: carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno, y micronutrientes como el calcio, magnesio, zinc, vitaminas, entre otros.

Las levaduras son microorganismos facultativos, lo que significa que tienen la capacidad de vivir en presencia o ausencia de oxígeno, es decir, aeróbia o anaeróbicamente.

3.4.1 Metabolismo aeróbico La levadura utiliza el mecanismo de respiración o ruta metabólica aeróbica con el fin de obtener energía para crecer y reproducirse. La fuente de energía la constituyen los azúcares fermentables (glucosa y fructosa) que son absorbidos a través de la pared celular, al igual que el oxígeno. Dentro de la célula se desencadenan una serie de reacciones bioquímicas donde los principales productos son la energía en forma de molécula de ATP (Adenosin Trifosfato) y el dióxido de carbono (CO_2) el cual se envía hacia el exterior de la célula a través de la pared celular. La energía obtenida de la molécula de ATP se utiliza en el crecimiento y reproducción de la célula (véase figura 4). (11)

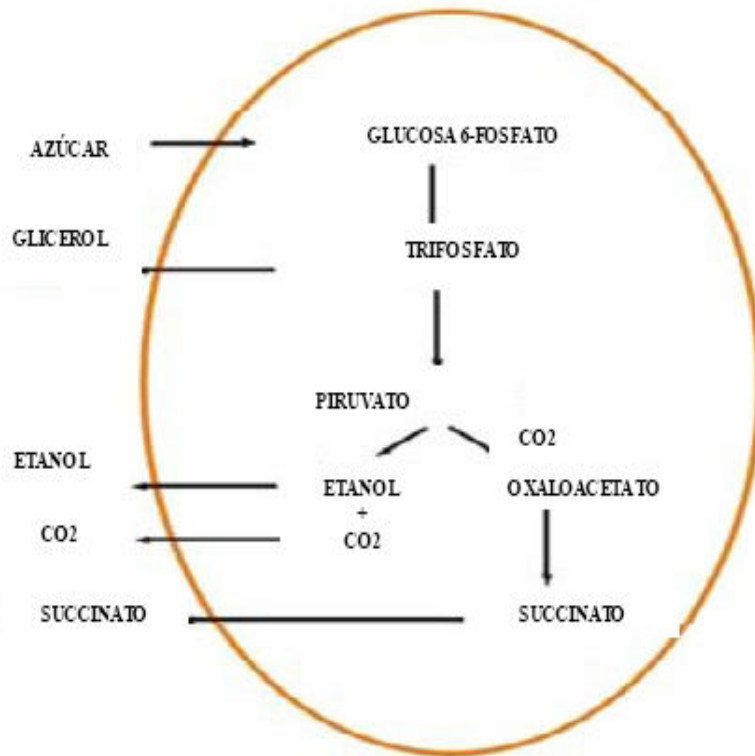
Figura 4. Metabolismo aeróbico (Respiración)



3.4.2 Metabolismo anaeróbico Este proceso se lleva a cabo en ausencia de oxígeno. La levadura absorbe, a través de la pared celular, los azúcares fermentables (glucosa y fructosa) y desarrolla una serie de reacciones bioquímicas cuyos productos son alcohol etílico (etanol), CO₂, glicerol y succinato; los cuales son enviados al exterior de la célula por medio de la pared celular. Los productos generados en mayores proporciones durante este proceso son el etanol y el CO₂. Este mecanismo lo usa la célula únicamente para su conservación y no para su crecimiento ni reproducción (véase la figura 5). (11)

Esta propiedad de la levadura para producir etanol se aprovecha industrialmente para la producción de licores, alcohol industrial o alcohol carburante. Es importante aclarar que dentro del proceso fermentativo la concentración de alcohol es una variable a controlar, debido a que niveles muy altos (teóricamente superiores al 18%) afectan negativamente la misma levadura generando estrés osmótico, inhibición competitiva, oxidación, entre otros. De igual forma se destaca el hecho de que el porcentaje de tolerancia al alcohol depende de la capa de levadura utilizada. (9)

Figura 5. Metabolismo anaeróbico (Fermentación) (1)

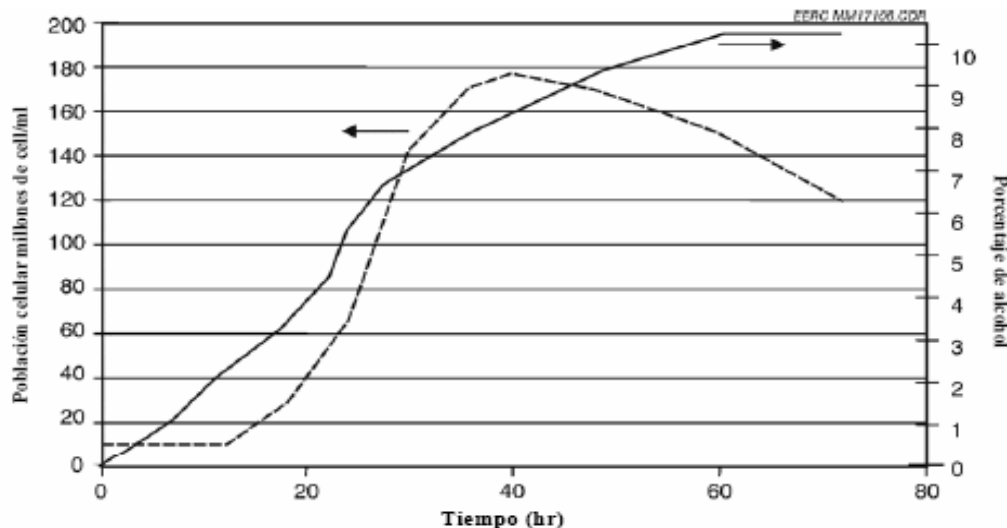


3.4.3 Población y viabilidad Una sola célula de levadura produce tan solo cantidades microscópicas de alcohol, por lo tanto, se requieren cientos de millones de ellas para obtener las concentraciones de alcohol demandadas a escala industrial. (1)

En el proceso de fermentación se mide la concentración celular por medio de un parámetro llamado **población celular**; éstas varían entre 250 y 300 células por mililitro o entre 10 -12 gramos de célula en peso seco por litro. Se recomienda que esta población esté realizando el proceso de producción de alcohol y para ello deben estar vivas, lo cual se determina por medio del parámetro llamado **viabilidad**, definido como el número de células vivas por número de células totales. En la etapa de fermentación el valor apropiado de viabilidad debe ser mayor o igual a 90%. (1)

3.4.4 Cinética de crecimiento En lo que se refiere al crecimiento celular existe un mecanismo que permite visualizar el comportamiento de la levadura a través del tiempo y se denomina cinética de crecimiento. Esquemáticamente se puede representar como se muestra en la figura 6. (8)

Figura 6. Cinética de crecimiento de la levadura



En la figura 6 se observan cuatro etapas de crecimiento. La primera, llamada fase latente, es la etapa de adaptación del microorganismo al medio donde se está desarrollando, en ella se presenta un mínimo crecimiento en la población de la levadura. En la segunda etapa, denominada fase de crecimiento, las células presentan una alta velocidad de reproducción por lo que se incrementa notablemente la población. En la siguiente etapa, la fase estacionaria; al igual que en la primera fase, no se presenta aumento en la población celular, es una etapa donde el cultivo alcanza un estado de sólo supervivencia. La cuarta etapa y última fase representa la muerte de la levadura. (8)

3.4.4.1 Fase latente Se caracteriza por la síntesis y degradación del material celular y adaptación al nuevo medio ambiente. La expresión matemática que representa este comportamiento es la siguiente:

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (1)$$

donde x es biomasa y t es tiempo: Esto significa que no existe cambio de la concentración celular o de biomasa con el tiempo. (8)

3.4.4.2 Fase de Crecimiento Esta etapa está caracterizada por la reproducción y multiplicación del microorganismo a máxima velocidad. En consecuencia, se requiere que los nutrientes estén en exceso y, además, evitar al máximo una mezcla incompleta o la precipitación de los componentes del medio. Asimismo, se debe tener en cuenta que existen elementos inhibidores de la levadura tales como SO₂, sulfitos, ácidos orgánicos, iones de cobre y el mismo etanol, que debe estar presentes en el medio de cultivo en muy bajas concentraciones. (8)

La fase de crecimiento está ligada tanto al medio de cultivo como a la especie de levadura. Es importante anotar que la levadura, como cualquier organismo vivo, no tiene un crecimiento infinito por lo que es necesario contemplar esta condición para lograr una apropiada operación de la etapa de propagación. (8)

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2)$$

Donde μ es la velocidad de crecimiento del microorganismo y adquiere valores desde $\mu = 0$ hasta $\mu = \mu_{\text{máx}}$ que es la velocidad máxima de crecimiento del microorganismo. Entonces,

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\text{máx}} x \quad (3)$$

Integrando,

$$\ln x - \ln x_0 = \mu_{\text{máx}} t \quad (4)$$

Donde x_0 es la concentración celular inicial. Graficando el logaritmo natural de x como una función del tiempo, la pendiente = $\mu_{\text{máx}}$. En resumen, las ecuaciones mostradas, junto con datos obtenidos en el laboratorio, permitirán establecer las mejores condiciones de operación de los tanques de propagación. (8)

Cuando la ecuación (4) se expresa de la forma

$$\ln \left(\frac{x}{x_0} \right) = \mu_{\text{máx}} t \quad (5)$$

Se obtiene la ecuación fundamental para crecimiento en lote

$$x = x_0 e^{\mu_{\text{máx}} t} \quad (6)$$

Cuando $x = 2x_0$, $t = t_d$ = tiempo de duplicación

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} = \frac{0.693}{\mu_{\text{máx}}} \quad (7)$$

Este parámetro permite establecer el tiempo requerido para lograr la población celular que se desea cuando se opera por lotes (propagación). (8)

3.4.4.3 Fase estacionaria En la fase estacionaria no se presenta incremento de la población celular, es decir, el número de células que mueren es igual al número de células que se duplican. (8)

Los parámetros anteriormente descritos, que suceden durante el periodo normal de vida de la levadura, son supremamente útiles al momento de operar

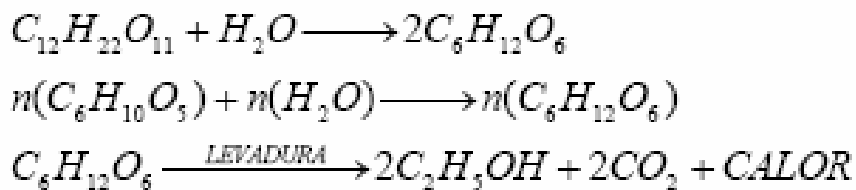
apropiadamente el proceso. Con base en la velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y el tiempo de duplicación de la levadura (t_d) se realiza el diseño del biorreactor, las ecuaciones previamente descritas son aplicables a sistemas de fermentación por lotes y no son aplicables a la fermentación continua. (8)

Para el caso de la fermentación continua, la operación apropiada de los biorreactores se establece por medio de balances de nutrientes y celular. (8)

3.5 PROCESO DE FERMENTACIÓN

En general, es el proceso mediante el cual se obtiene alcohol etílico, a partir de azúcares fermentables, usando como catalizador organismos vivos (levadura). En el caso de la planta de alcohol carburante del Ingenio Risaralda se usa específicamente la levadura *Sacharomyces cerevisiae* en un proceso continuo, con recirculación de levadura y de vinaza. La cepa utilizada se conoce como GR y es suministrada por la compañía PRAJ. (1)

La reacción bioquímica que se lleva a cabo en la fermentación alcohólica se muestra a continuación:



La estequiometría de la reacción establece que por cada 100 gramos de glucosa/fructosa que se consumen, se obtienen 51.1 gramos de alcohol etílico. Sin embargo, la máxima eficiencia que se logra en el fermentador está alrededor del 87% al 89% pues coexisten reacciones adversas que impiden aprovechar completamente los azúcares. (1)

3.6 FACTORES QUE AFECTA LA LEVADURA EN LA FERMENTACIÓN (1)

La levadura, por ser un ser vivo, requiere de condiciones apropiadas en el medio para que su desempeño sea satisfactorio. Este microorganismo es altamente sensible a cambios de temperatura, pH, materia prima, presencia y calidad de los nutrientes, concentración de sales, condiciones de higiene y asepsia, variedad de la caña y concentración de alcohol, entre otros.

3.6.1 Materia Prima La materia prima utilizada en el ingenio para la producción de etanol puede ser obtenida de diferentes etapas en el proceso de elaboración del azúcar. Puede utilizar jugo clarificado, meladura clarificada o sin clarificar, miel de segunda extracción (Miel B), o cualquier combinación entre estas corrientes. La diferencia fundamental entre estas corrientes está en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa. La levadura consume glucosa y fructosa, los dos monosacáridos que conforman la sacarosa, la cual se desdobra por medio de la acción de una enzima (la invertasa contenida en la levadura) y por la inversión ácida de la sacarosa.

Tabla 8. Parámetros a tener en cuenta en la fermentación

Componente	Concentración %	Observaciones
Azúcares fermentables		
Sacarosa	25 - 32	Favorecen
Glucosa	6 - 7	Favorecen
Fructosa	7 - 9	Favorecen
Sales		
Mg, Na, SO ₄ , Mn, Fe, Al, etc.	2.4 – 3.4	Favorecen
Ca, K, Si		Inhibidores
Otros compuestos orgánicos		
Proteínas, compuestos nitrogenados	1 - 3	Favorecen
Grasas, esteroides, fosfolípidos	0.4 - 1	Favorecen
Ácidos orgánicos especialmente aconítico y láctico	3 - 4	Inhibidores
Ácidos volátiles (acético, propiónico, butírico, valérico)	0.5- 2	Inhibidores

En este sentido, la caña de azúcar representa el origen común de estas materias primas por lo que, los nutrientes obtenidos por ésta durante su vida, son transferidos directamente a los jugos y mieles que se obtienen en las diferentes etapas del proceso de producción de azúcar. Por todo lo anterior, se debe prestar especial atención en el campo y en la fábrica con la adición de los diferentes biocidas, pesticidas, nutrientes y madurantes, al igual que los aditivos como la cal, azufre, floculantes y blanqueadores para evitar efectos negativos en la etapa de fermentación. En este punto cabe mencionar que la formación de caramelos, debido a la exposición de mieles a altas temperaturas, también afecta negativamente el proceso de fermentación. (4)

En la tabla 8 se describen los diferentes elementos provenientes de los jugos y mieles que afectan la levadura y las concentraciones y la forma cómo la favorecen o la desfavorecen. (1)

3.6.2 Almacenamiento de la materia prima El jugo diluido y la meladura están expuestos a la contaminación bacteriana debido a que poseen baja presión osmótica, baja viscosidad y alta concentración de azúcares. Por este motivo, al cabo de un par de horas, se inicia la acción bacteriana sobre ellas. Estas bacterias llegan al fermentador y compiten con la levadura por los azúcares y los nutrientes.

Debido a que el tiempo de duplicación de las bacterias está alrededor de 20 minutos, mientras que el de la levadura está entre dos y tres horas, se produce una alta concentración si estas dos materias primas no son esterilizadas.

De otro lado, en la miel B y en la miel C (segunda y tercera extracción respectivamente), por manejar altas viscosidades, la sensibilidad a la penetración bacteriana es menor y, pese a que poseen alta concentración de azúcares, se pueden almacenar en condiciones adecuadas. La miel C puede llegar a almacenarse por meses sin ningún problema y la miel B hasta por 50 días. Si estas mieles se almacenan a más de 40°C pueden formar caramelos no deseados en el proceso.

La materia prima para el inicio del proceso de propagación de la levadura en el laboratorio se desea de alta calidad, por ello se prefiere que sea meladura clarificada y esterilizada. Para la etapa de propagación en planta se prefiere utilizar meladura y miel de segunda extracción (miel B). (1)

3.6.3 Azúcares fermentables Como se indicó en el metabolismo de la levadura, la glucosa es la fuente de energía que ella toma para transformarla, bien sea en su reproducción o en la fermentación. Se consideran como azúcares fermentables la sacarosa (compuesta de una molécula de glucosa y una de fructosa), la glucosa y la fructosa, pues son los únicos azúcares que la levadura fermenta, convirtiéndolas en alcohol. La concentración de azúcares fermentables debe ser alta, con el fin de incrementar la producción de alcohol y disminuir la cantidad de subproductos como la vinaza, pero tiene un límite máximo a partir del cual inhibe la levadura debido a que aumenta la presión osmótica del medio de cultivo; esto depende de la levadura utilizada. (1)

3.6.4 Contenido total de materia orgánica La materia orgánica está representada por el contenido de proteínas, almidones, dextranas, ácidos, azúcares no fermentables, xilosa, arabinosa y polímeros.

Los azúcares no fermentables son los azúcares como las pentosas, xilosas y sólidos que la levadura no puede fermentar, pues su metabolismo no está estructurado para asimilarlas. El contenido de azúcares no fermentables varía dependiendo de la variedad de la caña. Un parámetro importante para tener en cuenta es la relación entre azúcares fermentables y azúcares no fermentables (F/N) este valor puede variar entre 0.7 y 2.7; mientras más alto sea este valor, más eficiente será la fermentación. (1)

3.6.5 Contenido total de materia inorgánica y cenizas Las sales disueltas afectan la presión osmótica del medio de cultivo y por ende de la levadura, disminuyendo la actividad de la misma, por ello se requiere un bajo contenido de cenizas en las mieles a utilizar. Los elementos que conforman la materia inorgánica son: calcio, potasio, sílice, hierro, manganeso, óxidos, nitratos, compuestos clorados. Generalmente las mieles con alta relación de azúcares fermentables a azúcares no fermentables poseen bajo contenido de ceniza. (1)

3.6.6 Contenido de sólidos sedimentables Los sólidos sedimentables poseen sulfatos de calcio y magnesio, algunas proteínas y células muertas. Un alto contenido de sólidos sedimentables supone problemas de precipitación y de lodos. Adicionalmente, y considerando que el proceso de destilación se desarrolla a temperaturas relativamente altas, puede ocurrir la incrustación de estas sales en los rehervidores y demás equipos del proceso de destilación. (1)

3.6.7 pH Todos los microorganismos tienen un pH ideal para desarrollarse y crecer. El pH en la fermentación debe mantenerse entre 4.0 y 4.7 para obtener una actividad óptima de la levadura y reducir la actividad microbiana de bacterias indeseadas. El pH de la fermentación debe ajustarse con ácido sulfúrico si es necesario. Debe tenerse en cuenta que sobre este parámetro tiene incidencia directa la capacidad buffer de la melaza. (1)

3.6.8 Temperatura La temperatura es uno de los factores críticos para que el progreso de la fermentación sea apropiado. La reacción de generación de alcohol es exotérmica, es decir, genera calor continuamente y este calor debe ser retirado. Cada tipo de levadura tiene una temperatura óptima para su correcto desempeño la cual varía entre 30°C y 35°C. Incrementos de la temperatura reducen la actividad enzimática de la levadura, y por ende la fermentación se hace lenta. Asimismo, por encima de 35°C hay desarrollo de bacterias mesófilas indeseadas. (1)

3.6.9 Acidez volátil orgánica La acidez volátil se refiere principalmente a la presencia de ácido acético, ácido propiónico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido isobutírico y ácido butírico. Los ácidos son tóxicos para la levadura, disminuyen su actividad y pueden causar su muerte. Un alto contenido de estos ácidos incrementa el tiempo de fermentación, y genera subproductos por las reacciones colaterales con el azúcar, disminuyendo la eficiencia de la fermentación. Adicionalmente, el incremento en acidez volátil es un indicador de la presencia de bacterias en la fermentación. (1)

Normalmente, se pueden encontrar mieles con acidez volátil entre 500 ppm y 2500 ppm. Los valores máximos a aceptar para este parámetro, sin que afecten notablemente la actividad de la levadura, están entre 2500 ppm y 5000 ppm. (1)

3.6.10 Contenido de Caramelos Los caramelos se forman por la exposición de los azúcares, durante un tiempo prolongado, a altas temperaturas. Los caramelos colorean las mieles generando un color café oscuro. Se ha observado que altos contenidos de caramelos en las mieles pueden retardar al doble de tiempo la fermentación. (1)

3.6.11 Contenido de bacterias El contenido de bacterias se define como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Comúnmente se pueden encontrar valores entre 1×10^2 UFC – 1×10^3 UFC cuando se inicia la fermentación. Por ser de un tamaño menor que el de la levadura, deben observarse al microscopio con un lente de orden de 100x. Las bacterias se reproducen más rápidamente que la levadura y compiten por el azúcar, causando disminución en el rendimiento del alcohol y generando subproductos indeseados. (1)

3.6.12 Sodio La mayoría de los equipos utilizados en el área de fermentación se limpian con una solución de hidróxido de sodio (NaOH). Esta solución debe retirarse completamente después de la limpieza debido a que los residuos de sodio causan cambios indeseados en la morfología de la levadura, observándose mas ovalada de lo normal y ocasionando cambios genéticos en ésta. (1)

3.6.13 Relación carbono/Nitrógeno El contenido de nitrógeno, al igual que el contenido de la fuente de energía o carbono, son de mucha importancia en la fermentación. El nitrógeno es necesario para la generación de proteínas constituyentes de las células, es decir de la levadura. Este nitrógeno es adicionado al medio de cultivo como urea cuando el etanol que se va a producir no es de consumo humano; de lo contrario, se recomienda utilizar Difosfato de Amonio (DAP) como fuente de nitrógeno. (1)

3.6.14 Contenido celular Cuando el reactor tiene un alto contenido celular, la fermentación se torna más eficiente, pues son más células trabajando para producir etanol. El contenido de células en un sistema sin recirculación debe ser del orden de 80×10^6 cell/ml a 100×10^6 cell/ml (células por mililitro). En sistemas con recirculación debe ser del orden de 350×10^6 cell/ml para incrementar la productividad de la fermentación, es decir, se disminuye el tiempo de fermentación. (1)

3.6.15 Tiempo de residencia En procesos continuos, el tiempo de residencia es el tiempo de permanencia de una partícula que ingresa al interior de un recipiente antes de ser evacuada por la corriente de descarga. En particular, la expresión matemática que le corresponde es el volumen del fermentador dividido por el flujo de salida. (1)

Cada sistema de fermentación está diseñado para un tiempo de fermentación determinado; la prolongación de este tiempo de fermentación puede generar

incrementos en la población bacteriana con el consecuente aumento en la acidez volátil. Por otro lado, tiempos de residencia muy bajos impiden que los microorganismos procesen completamente los azúcares residuales disminuyendo la eficiencia de la fermentación. (1)

3.6.16 Agitación en el fermentador Por medio de agitadores se mejora la transferencia de nutrientes entre el medio y la levadura homogenizando el medio en los fermentadores. El CO₂ que se genera en la fermentación también ayuda a la agitación de la mezcla y a mantener las partículas en suspensión. (1)

3.6.17 Concentración de etanol La tolerancia a la concentración de alcohol depende del tipo de levadura, esta puede variar desde un 5% v/v a 23 %v/v (volumen a volumen). El etanol afecta negativamente la pared celular y las enzimas intracelulares de la levadura. (1)

En la tabla 9 se muestra un resumen de las características en la materia prima y los efectos ocasionados en la fermentación. (1)

3.7 FERMENTACIÓN CONTINUA CON RECIRCULACIÓN DE LEVADURA

El proceso de fermentación de alcohol está conformado por tres etapas principales: propagación, fermentación - separación, y recirculación de levadura. En la planta de alcohol del Ingenio Risaralda S.A. el proceso de fermentación es continuo, se inicia con la preparación y propagación de la levadura a nivel de laboratorio. De este proceso es responsable el área de microbiología y exige buenas prácticas de laboratorio y de asepsia en el mismo. Esta etapa se considera de alta vulnerabilidad en el proceso ya que debe garantizar un inóculo libre de contaminación en las cubas de reproducción en planta.

3.8 ETAPA DE PROPAGACIÓN

La levadura suministrada por la compañía PRAJ, denominada cultivo maestro, está preservada en medio con glicerol. El primer paso consiste en activar la levadura en un medio líquido adecuado para su crecimiento. Una vez activada se llevan a cabo dos siembras: una para prueba cualitativa de contaminación bacteriana y la otra para continuar la propagación de la levadura. Para continuar la propagación es preciso confirmar que la levadura se encuentre libre de contaminación, es decir, que la prueba cualitativa sea negativa.

Tabla 9. Características de la materia prima

Parámetro	Concentración	Efecto
F/N: Fermentables/No fermentables	0.85 a 1.45 en miel final 1.15 en meladura	Alta relación favorece la fermentación. A mayor valor, permite la recirculación de no fermentables sin afectar el proceso y por lo tanto favorece la recirculación de vinaza.
Sólidos no fermentables	Máximo 17%	No se debe superar este valor porque la fermentación disminuye.
Nitrógeno fermentable	200-300 ppm en mieles requerido entre 600 a 800 ppm.	El N fermentable es requerido como nutriente de las levaduras en la fermentación.
Sólidos totales	75 -80 % w/w	Afecta la viscosidad y por lo tanto las propiedades de flujo
Cenizas inorgánicas totales	7 -14% A mayores concentraciones pueden ocasionar toxicidad a la levadura	
Ca como sulfato	0.5 – 4%	Causa incrustaciones. Valores alrededor del 2% se consideran normales.
Sólidos orgánicos precipitable	1.5- 4%	Incrementa la presencia de puntos muertos, infección bacterial.
Capacidad buffer pH	4.8 - 8	Si es muy alto, incrementa los requerimientos de ácido para el proceso
Características espumantes	Prueba cualitativa	Si alto, se incrementa el uso de antiespumante
Caramelo	0.1 – 7.0	Inhibe severamente las levaduras, afectan eficiencias y producción de alcohol
Bacterias y levaduras salvaje	100 – 50.000 UFC/g	Inhibe levadura
Ácidos volátiles	2500 - 5000 ppm debe mantenerse en 2000 ppm en el fermentador	Retarda el crecimiento de la levadura, la productividad y reduce el rendimiento.
Trazas de sustancias inhibidoras		Se requiere el uso de biocidas. El amonio cuaternario usado en los medios hasta concentraciones de 10ppm no representa problemas. Existen biocidas que no son biodegradables con la temperatura pero pueden llegar a las mieles o meladuras que impiden la fermentación.

El proceso de preservación de levadura consiste en colocar una colonia aislada de la placa de siembra en un tubo de ensayo con medio de cultivo para crecimiento y dejarla incubar en un agitador con temperatura controlada entre 28 y 32°C durante 24 horas. Este procedimiento se repite para diez tubos de ensayo con 12 ml de medio de cultivo cada uno, los cuales son preservados a 4°C. El tubo de ensayo con material preservado constituye el cultivo de trabajo. Para mantenimiento de las condiciones de la cepa se realiza pases del cultivo cada dos o tres meses.

En la figura 7 se muestra el esquema de propagación de la levadura. Partiendo del cultivo de trabajo que se tiene preservado, se toma un inóculo y se pasa a seis tubos de ensayo con miel B o meladura como medio de cultivo a una concentración de azúcares fermentables del 5% para hacer incubados bajo agitación (90 – 100 rpm) y temperatura controlada (30 -32°C) durante 20 horas, los cuales constituyen la etapa L1. Cada etapa siguiente tiene como medio de cultivo melaza a la concentración de azúcares fermentables ya mencionada y requiere como inóculo todo el volumen de la etapa anterior. La etapa L2 o segunda etapa

de laboratorio y L3 requieren un volumen de 5 y 15 litros respectivamente de cultivo que es igualmente manejado a temperatura y agitación controlada. El tiempo de incubación desde L2 a L3 es de 20 a 24 horas, cada una. El volumen de 15 litros obtenidos del laboratorio es inoculado a T1 y así sucesivamente se transfiere desde T1 a T4, cada vez con el objetivo de aumentar biomasa de levadura. Finalmente, se tiene el cultivo para cargarse al fermentador de la planta. Las condiciones de aireación son de 1 vvh (volumen de aire por volumen de medio por hora).

Figura 7. Esquema de propagación de levadura

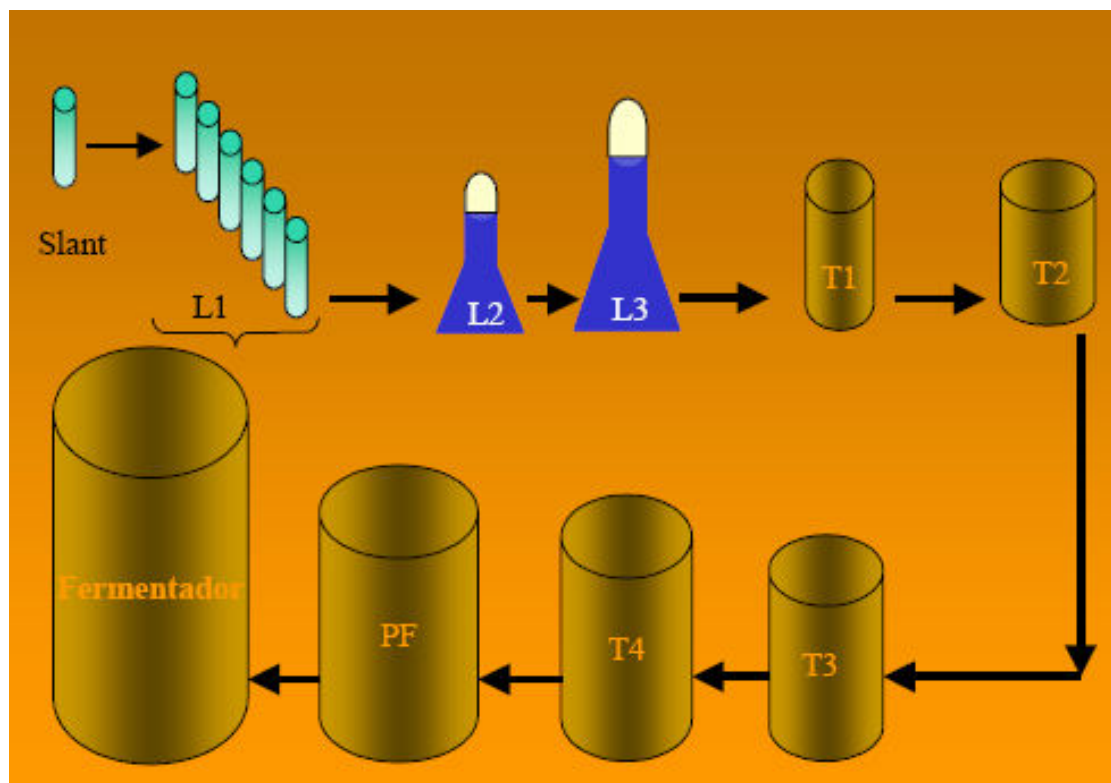
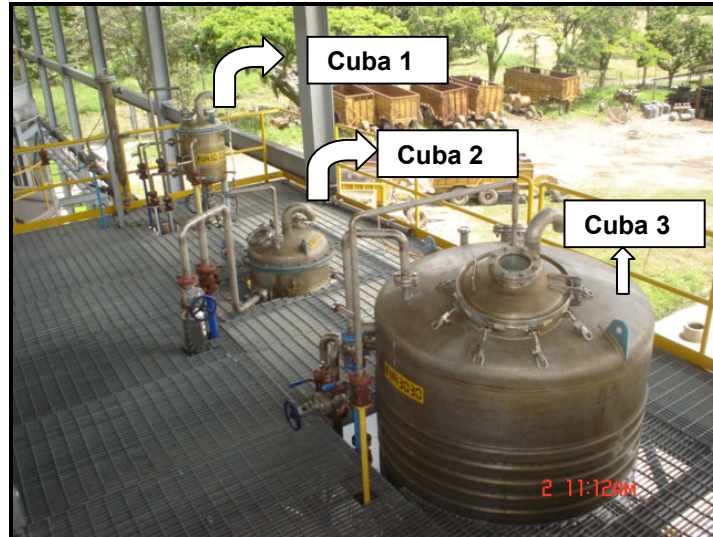


Figura 8. Fotografía Cubas de Propagación de la Planta de alcohol del Ingenio Risaralda



3.9 ETAPA DE FERMENTACIÓN

En el ingenio Risaralda S.A. existen dos fermentadores (Ver figura 9) para llevar a cabo la producción de alcohol a las concentraciones deseadas. El tiempo de residencia es un factor importante en el proceso y depende de la concentración celular, de la productividad y de la concentración de alcohol.

Figura 9. Fotografía de los fermentadores de la Planta de alcohol del Ingenio Risaralda S.A.



3.10 RECIRCULACIÓN DE LEVADURA (1)

La Recirculación de levadura genera los siguientes beneficios:

- ❖ Reducción en el tiempo de residencia hidráulico que ayuda al lavado de bacterias.
- ❖ Incremento de la eficiencia de fermentación debido a la reducción de los subproductos de la fermentación y en la generación de células nuevas.
- ❖ Reducción en los costos de inversión de capital ya que los fermentadores son más pequeños y por ende algunos de los equipos asociados a ellos.

El sistema de separación de levadura usa como principio de separación la sedimentación por gravedad (figura 10), aprovechando el hecho que la densidad de la levadura es mayor que la densidad del mosto. Desde el punto de vista operativo se requiere que la velocidad de sedimentación de la levadura sea mayor a la velocidad de flujo en el sistema, cabe anotar que la levadura muerta no sedimenta sino que sobrenada, por ello sale del sistema junto con el vino.

Figura 10. Fotografía del Sedimentador de la Planta de alcohol del Ingenio Risaralda S.A.



Esta parte del proceso consta de un sedimentador en forma cónica y de un tanque de activación celular donde se dispone la crema separada (véase figura 11). Del sedimentador se retira por rebose el mosto que va hacia la destilería y del fondo la crema de levadura. (1)

Figura 11. Esquema de recirculación de levadura



Algunas de las ventajas que se han encontrado con la recirculación de levadura mediante el sedimentador son:

- ❖ No recicla los lodos
- ❖ Ahorro en energía y mantenimiento ya que no necesita de centrifugas, es decir, altas velocidades mecánicas para su separación.
- ❖ Ahorro de la solución de limpieza.

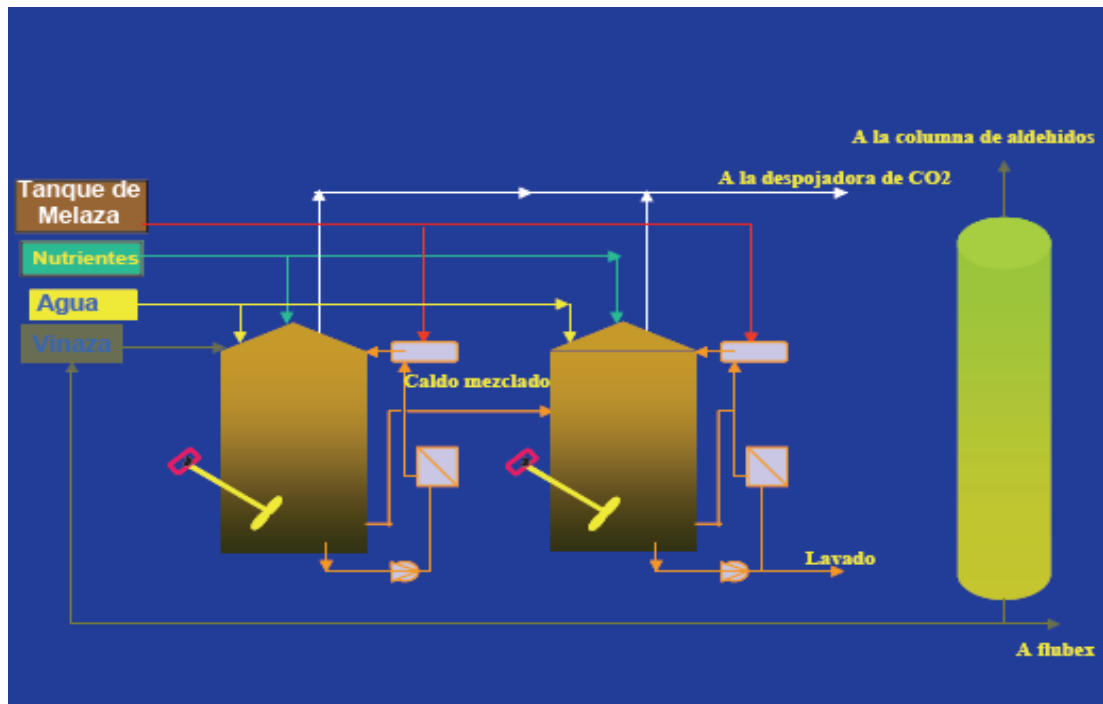
Figura 12. Fotografía del Sistema de recirculación de levadura de la planta de alcohol del Ingenio Risaralda



3.11 RECIRCULACIÓN DE VINAZA

El esquema de recirculación de vinaza surge de la necesidad de reducir la generación de efluentes, de reducir el consumo de agua de proceso y de reciclar nutrientes. En la figura 13 se muestra un esquema del proceso.

Figura 13. Esquema de recirculación de vinaza.



La cantidad de vinaza recirculada depende de la concentración de sólidos en el vino que es una función de la relación F/N y del nivel de ácidos volátiles como función de los ácidos volátiles alimentados.

De acuerdo con la experiencia de la compañía PRAJ, la cantidad de vinaza recirculada es una función de la composición del alimento, del diseño, del proceso, del tipo de levadura utilizado, motivo por el cual saliendo de la planta se puede generar entre 2 y 3 L de vinaza/L de alcohol.

3.12 TIPO DE CONTAMINANTES EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA (5)

Cuando un proceso fermentativo tiene problemas en el rendimiento es importante establecer cuáles son las posibles causas e indicadores que están afectando el proceso. Entre éstos tenemos la pérdida en la producción de etanol, aumento de

ácidos orgánicos volátiles, muerte de la levadura, incremento en el número de bacterias, presencia de sabores extraños y productos no deseados. (5)

Los contaminantes que generalmente se encuentran en el proceso fermentativo son de tres tipos: (5)

- Bacterias Gram positivas: Células en forma de cocos y bacilos, productoras de ácido láctico, generalmente prefieren condiciones anaeróbicas y son acidotolerantes. Entre éstas tenemos: ***Lactobacillus***, ***Pedicoccus*** y ***Leuconostoc***.
- Bacterias Gram negativas: Células en forma de bacilos, oxidan el etanol a ácido acético, son aerobias obligadas, causan problemas serios en la propagación de la levadura y son ácidoalcohol tolerantes. Entre éstas tenemos: ***Acetobacter***, ***Gluconobacter*** y ***Zymomonas***. Otro tipo de bacterias Gram negativas, aerobias facultativas, que se consideran contaminantes son:
 - Coliformes totales como el ***Aerobacter*** que produce ácido a partir de la glucosa.
 - Levaduras salvajes: Aquellas que compiten por nutrientes con ***S. cerevisiae***. También están las llamadas levaduras asesinas productoras de toxinas de carácter proteico y glicoproteico fatales para otro tipo de levaduras.

3.12.1 Bacterias lácticas Son bacterias Gram positivas que obtienen la energía exclusivamente por fermentación de azúcares, carecen de ciclo de Krebs funcional, requieren factores nutritivos especiales (aa, bases nitrogenadas y vitaminas) lo que contribuye a su reducido crecimiento en medios comunes, toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajo que otras bacterias lo cual facilita su colonización.(5)

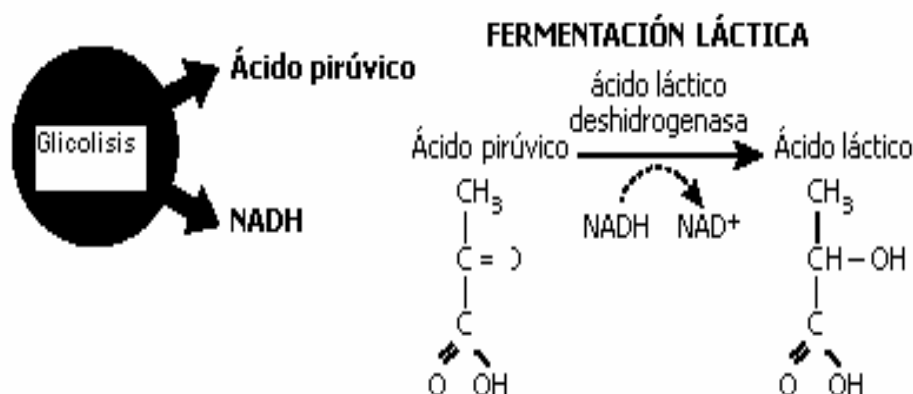
Las bacterias lácticas son importantes a nivel industrial porque fermentan azúcares produciendo cantidades considerables de ácido láctico lo que permite su empleo en la elaboración de productos fermentados vegetales y lácticos y en la elaboración industrial de ácido láctico pero perjudiciales para otros productos como el vino o cerveza y el alcohol. (5)

La termoresistencia o propiedades termodúricas de la mayoría de los ***Lactobacillus*** que crecen bien a temperaturas altas, es lo que les permite sobrevivir a la pasteurización y a otros tratamientos térmicos. (5)

3.12.2 Fermentación ácido láctica La fermentación ácido láctica es aquella que se lleva a cabo por las bacterias ácido lácticas cuya actividad se desarrolla en

ausencia de oxígeno (anaerobiosis), y se manifiesta en la transformación de los azúcares presentes en la materia prima, en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono (figura 14). (5)

Figura 14. Fermentación ácido láctica



3.12.3 Bacterias acéticas Son bacilos Gram negativos polimórficos, aerobias obligadas, no esporógenos, oxidan el alcohol etílico a ácido acético y transforman otros compuestos orgánicos en productos de oxidación diversos. Crecen generalmente en el intervalo de 5 – 8 días a 35 – 40 °C. (5)

Acetobacter aceti es la especie más importante en este grupo de bacterias debido a que utiliza el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, tiene flagelos peritricos cuando son móviles y utilizan el ácido láctico como nutriente. Es capaz de metabolizar hexosas para oxidar el etanol y son acidotolerantes. Otra especie importante es ***Gluconobacter oxidans*** capaz de metabolizar cierto número de hexosas y pentosas realizando oxidación incompleta de los alcoholes originando acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. (5)

Las bacterias acéticas son importantes para otros procesos industriales diferentes al de alcohol porque:

Oxidán el alcohol etílico a ácido acético, lo que las hace útiles en la fabricación del vinagre y perjudiciales para las bebidas alcohólicas.
Tienen un extraordinario poder oxidante que puede ser utilizado para eliminar especies nocivas.

Otro tipo de bacteria Gram negativa pero que no producen ácido acético es la ***Zymomonas mobilis*** que es un microorganismo con alta tolerancia al etanol, pero muy sensible a infecciones por otro tipo de bacterias y virus y además no fermenta los azúcares de hidrolizados lignocelulósicos. (5)

Entre las bacterias coliformes encontramos ***E. coli***, capaz de fermentar azúcares pero no tolera altas concentraciones de etanol y está asociado con enfermedad en el hombre.

Los contaminantes bacterianos compiten con la levadura por nutrientes como vitaminas y aminoácidos y los productos finales como el ácido láctico y acético inhiben la actividad metabólica de ***S. cerevisiae***, además se multiplican exponencialmente mientras la levadura se encuentra en fase de latencia. (5)

Utilizan los carbohidratos como la glucosa, que metabolizada por vía aeróbica o anaeróbica, es convertida a ácido pirúvico y a partir de éste se genera una cantidad de productos indeseados que a altas concentraciones afectan el metabolismo normal de la levadura (Figura 15). (5)

Dentro de estos ácidos encontramos el ácido láctico como producto final de las bacterias lácticas y el ácido acético que es generado por las bacterias acéticas en condiciones de aerobiosis o por bacterias termófilas como *Clostridium* en anaerobiosis. También se producen otro tipo de productos como glicerol, acetona, ácido butírico que son menos significativos. (5)

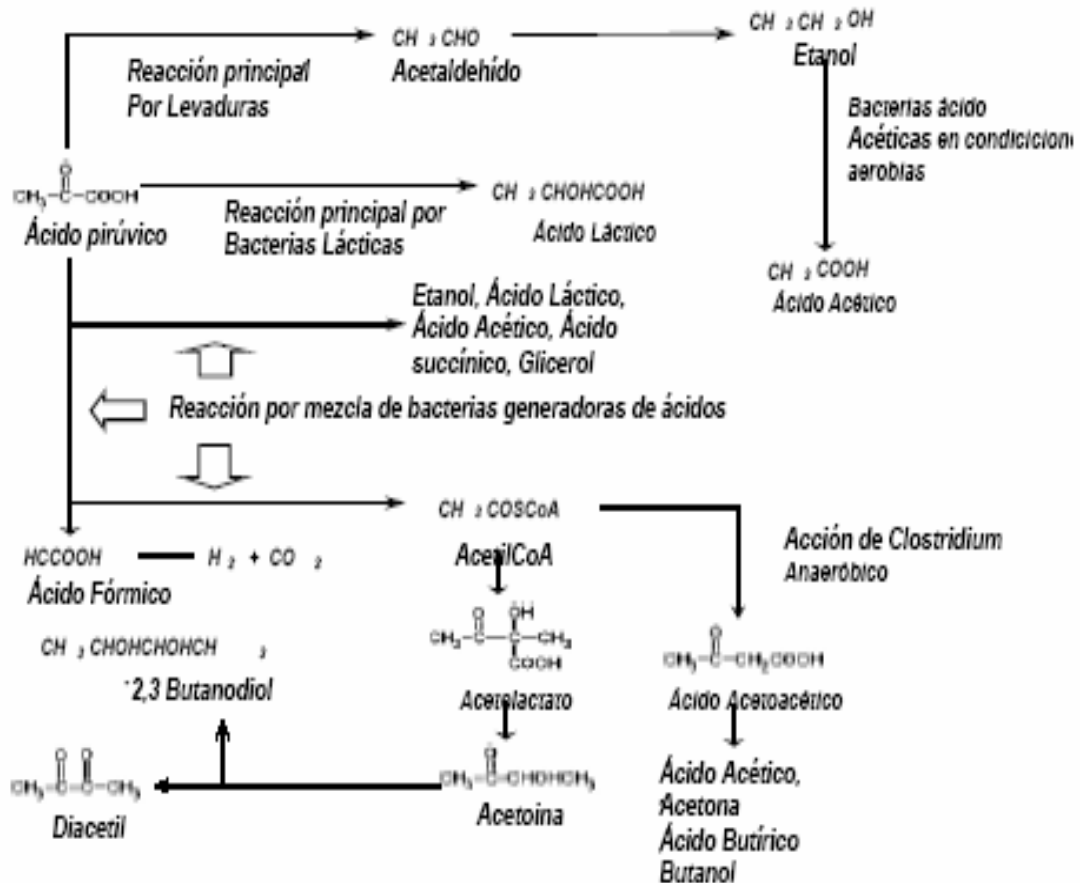
3.13 IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

La determinación de la concentración de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol es importante puesto que perjudican la eficiencia; las más implicadas son los *Lactobacillus sp* que producen ácido láctico como metabolismo principal, el cual tiene efecto inhibitorio sobre la levadura. Adicionalmente se pueden medir las bacterias mesófilas totales como indicadores del nivel de contaminación del sistema y otros microorganismos como los mohos y levaduras.

Se utiliza el procedimiento de recuento en placa. Después del tiempo de incubación se puede realizar técnicas de identificación como la coloración de Gram y catalasa para las bacterias y examen directo con Azul de Lactofenol y Cinta adhesiva para el montaje de hongos.

Figura 15. Reacciones metabólicas por bacterias

Reacciones metabólicas por bacterias



4. MARCO DE REFERENCIA

4.1 MARCO GEOGRÁFICO

El área de Fermentación está ubicada en la planta de alcohol del Ingenio Risaralda S.A. El cual geográficamente se encuentra en el municipio de Balboa Departamento de Risaralda. Aunque está mas cerca de la zona urbana del municipio de La Virginia a 2km vía La Virginia - Balboa a orillas del río Risaralda.

El ingenio Risaralda lleva 29 años prestando sus servicios a la comunidad y cada día quiere innovar con nuevos productos y tecnología el mercado nacional e internacional por tal razón entra en el mundo del alcohol carburante.

Figura 16. Vista superior de la Maqueta del Ingenio Risaralda S.A.



- | | |
|-----------------|--------------------------|
| 1. Fermentación | 4. Planta Eléctrica |
| 2. Destilación | 5. Planta de aguas |
| 3. Calderas | 6. Elaboración de azúcar |

La construcción de la planta de alcohol se inició en enero del 2005 y entró en operación el 28 de enero de 2006 alcanzando una producción de 16.389.235 litros

de los cuales el 98.3% fueron de alcohol carburante y el 1.7% de alcoholes para uso industrial durante este año.

En la figura 16 se puede visualizar una fotografía de una sección de la maqueta del Ingenio Risaralda y en donde se observa claramente donde se encuentra ubicada el área de fermentación y en donde se realizó el estudio de la acidez volátil.

4.2 TIPO DE ESTUDIO

Investigativo

4.3 ANTECEDENTES

Dentro del contexto industrial, El Ingenio Risaralda S.A. no había desarrollado ningún estudio previo sobre el contenido de acidez volátil, ya que no era necesario desde el punto de vista de la producción de azúcar. En la actualidad, con la producción de alcohol etílico, se hace necesario el desarrollo de un estudio detallado de esta variable y mucho más por el sistema de recirculación de vinaza que es una fuente rica en ácidos volátiles.

En Colombia, la mayoría de los estudios de acidez volátil se enfocan en el campo de la producción de vinos o bebidas alcohólicas como el ron, vodka entre otros.

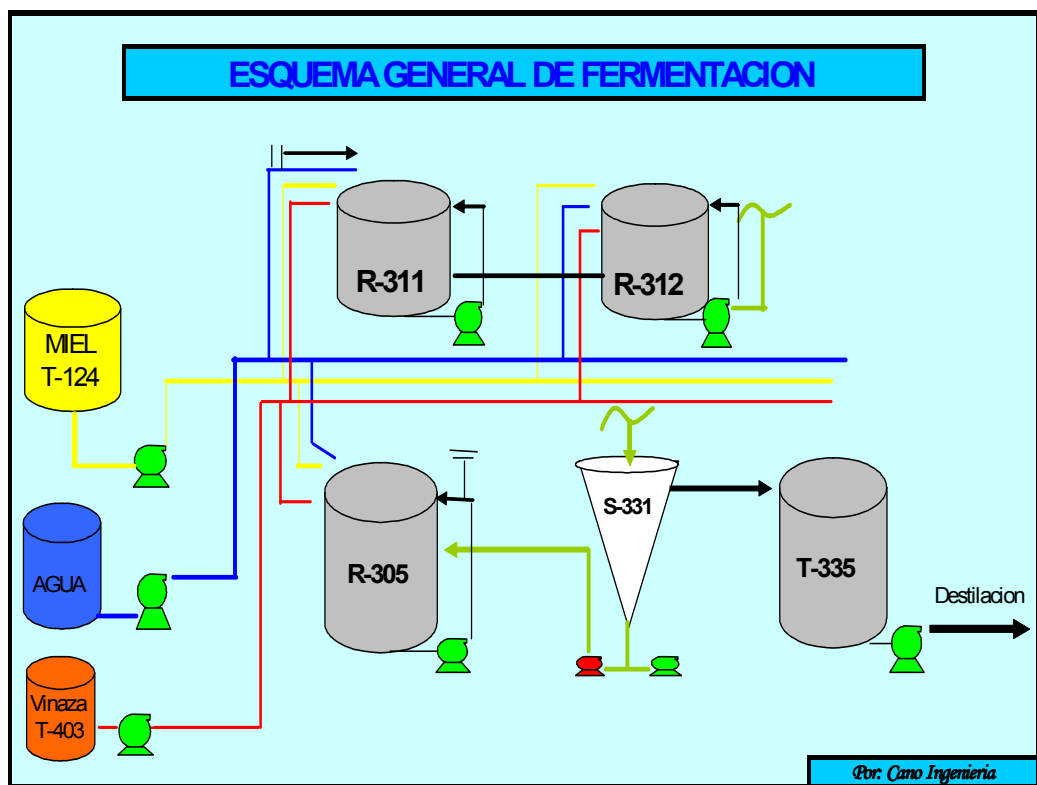
En el ámbito internacional se conoce que Brasil, uno de los más importantes productores de alcohol carburante en América latina y el mundo no utiliza de forma general la recirculación de vinaza como parte del proceso, pero actualmente algunas destilerías brasileñas están adaptando esta tecnología aunque los costos de adaptación son altos. Países europeos y Australia se encuentran en la misma situación, siendo India un país con gran desarrollo en este campo. (3)

5. METODOLOGÍA

5.1 PUNTOS DE MUESTREO

- ❖ Materia prima (Miel B y Jugo Clarificado) T-124
- ❖ Mosto fermentado del tanque de activación de levadura R-305
- ❖ Mosto fermentado del fermentador R-311
- ❖ Mosto fermentado del fermentador R-312
- ❖ Mosto fermentado del tanque receptor de mosto T-335
- ❖ Vinaza recirculada (T-403)

Figura 17. Esquema General de Fermentación



5.2 TOMA DE MUESTRAS

5.2.1 Análisis fisicoquímicos y cromatográficos

- ❖ Tanque de alimentación T-124: Muestra compuesta de 24 horas. Cada hora se tomó una muestra de 500mL y de allí una alícuota de aproximadamente 50mL para llegar a un volumen total de 1litro. La muestra permanecía en la nevera para evitar alteraciones. El tanque está ubicado en la sección de elaboración en la fábrica de azúcar.

Figura 18. Fotografía al tanque de alimentación T-124



- ❖ Fermentadores (R311 y R312), tanque de activación (R-305) y recibidor de mosto (T-335): Muestreo puntual cada 8 horas aproximadamente de 500 mL, cada tanque tenía una hora diferente de muestreo con el fin de analizar la muestra inmediatamente después de recolectada para así obtener resultados más confiables. Para el análisis de la acidez volátil titulable se realizaba un promedio por día de los resultados y para los análisis cromatográficos solo se analizaba una de estas tres muestras. Los tanques están ubicados en el área de fermentación en la planta de alcohol carburante.

Figura 19. Punto de muestreo Fermentador R-311



Figura 20. Punto de muestreo Tanque R-305



Figura 21. Punto de Muestreo Tanque T-335



- ❖ Tanque de vinaza (T-403): Muestreo puntual cada 24 horas aproximadamente de 500mL. Se procesaba inmediatamente llegaba al laboratorio. Se encuentra ubicado en el área de destilación y de allí la vinaza se regresa nuevamente al área de fermentación.

Figura 22. Punto de Muestreo Tanque de vinaza T-403



Como se puede observar en las figuras 18 al 22 cada tanque tiene su respectivo toma muestra y siempre están en continua agitación.

5.2.2 Análisis Microbiológicos Para este tipo de análisis las muestras fueron puntuales y se tomaron en frascos de vidrio limpios y estériles, de calidad pyrex o schott de boca ancha de aproximadamente 200 ml de capacidad con tapa rosca.

Se tomaron de sus respectivos toma muestras desinfectando con alcohol al 70%, con esto se asegura la asepsia requerida para este procedimiento, eliminando cualquier película o suciedad existente en la superficie del toma muestras que puedan interferir con el procedimiento. Así mismo proporciona protección contra la contaminación del medio ambiente y por lo tanto se asegura la integridad de la muestra.

Inmediatamente se hizo la recolección de las muestras, éstas fueron llevadas al laboratorio de Microbiología y procesadas, a cada una se les asignó un número el cual corresponde a la fecha en la cual fue tomada la muestra y la identificación del tanque.

5.3 MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

5.3.1 Equipos

- ❖ Equipo de destilación por arrastre de vapor, Alcotest Raypa.

Figura 23. Alcotest



- ❖ Cromatógrafo de gas Shimadzu GC-2010, con automuestreador, detector de ionización de llama, columna Rtx-1701 30m y 0.25 mmID de 14% cianopropilfenil - 86% dimetilpolisiloxano.

Figura 24. Cromatógrafo de Gases



- ❖ Densímetro Anton Paar DMA4500

Figura 25. Densímetro DMA 4500



- ❖ Titulador automático

Figura 26. Titulador Automático Methrom



- ❖ Microscopio Binocular
- ❖ Incubadora
- ❖ Autoclave
- ❖ Cabina Flujo Laminar
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Estufa secadora
- ❖ Contador de colonias

5.3.2 Material de vidrio

- ❖ Balones volumétricos de 10, 50 y 100mL
- ❖ Pipetas graduadas de 1, 2 y 10 mL
- ❖ Pipeta volumétrica de 10mL y 50mL
- ❖ Cajas de Petri de 100 x 15 mm
- ❖ Probeta graduada de 200 y 250 mL
- ❖ Vasos de precipitado de 150 , 250 y 500 mL
- ❖ Embudos de separación de 250mL
- ❖ Embudo en forma de V pequeño
- ❖ Viales con tapa de 2mL para el automuestreador

5.3.3 Reactivos

- ❖ Acido sulfúrico concentrado
- ❖ Hidróxido de sodio 0.1N
- ❖ Acido clorhídrico 0.1 N

- ❖ Ftalato ácido de potasio
- ❖ Sulfato de sodio anhidro
- ❖ Acido acético glacial
- ❖ Diclorometano
- ❖ Acido propiónico para CG
- ❖ Acido isobutírico para CG
- ❖ Acido n-butírico para CG
- ❖ Acido isovalérico para CG
- ❖ Acido Valérico para CG
- ❖ Solución salina a 0.85%
- ❖ Alcohol Etilico al 95%
- ❖ Acetona
- ❖ Alcohol de tipo industrial para el mechero
- ❖ Hipoclorito de sodio industrial
- ❖ Agua destilada

5.3.4 Gases

- ❖ Aire sintético cero
- ❖ Helio (gas de arrastre)
- ❖ Hidrógeno

5.3.5 Medios de cultivo

- ❖ Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) para lactobacilos
- ❖ Agar Plate Count para mesófilos

5.3.6 Otros implementos de Laboratorio

- ❖ Aro metálico para embudo de separación
- ❖ Soporte metálico
- ❖ Pipeteador
- ❖ Mechero de alcohol
- ❖ Palillos de madera
- ❖ Gradilla
- ❖ Cinta indicadora de esterilización
- ❖ Tijeras
- ❖ Cinta de papel
- ❖ Papel Kraf
- ❖ Espátula metálica
- ❖ Encendedor

5.3.7 Equipos de Protección Personal

- ❖ Tapabocas
- ❖ Cofia
- ❖ Indumentaria limpia
- ❖ Guantes desechables
- ❖ Delantal blanco
- ❖ Gafas

5.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

5.4.1 Acidez Volátil titulable en mieles y mosto fermentado en términos de ácido acético y sales de acetato. (6)

La fermentación alcohólica es un proceso no estéril. Las bacterias presentes en el mosto fermentado producen ácidos que son tóxicos para la levadura y afectan la productividad del proceso. La acidez volátil es una medida indirecta de la contaminación bacteriana en la materia prima y/o en el mosto fermentado. Para su determinación la muestra es acidulada y al destilarla se obtienen los ácidos volátiles que posteriormente se titulan con hidróxido de sodio estandarizado. En la figura 27 se indica cómo determinar la acidez volátil en mieles y mosto fermentado. (6)

Figura 27. Diagrama del procedimiento para determinar la acidez volátil titulable en mieles y mosto fermentado

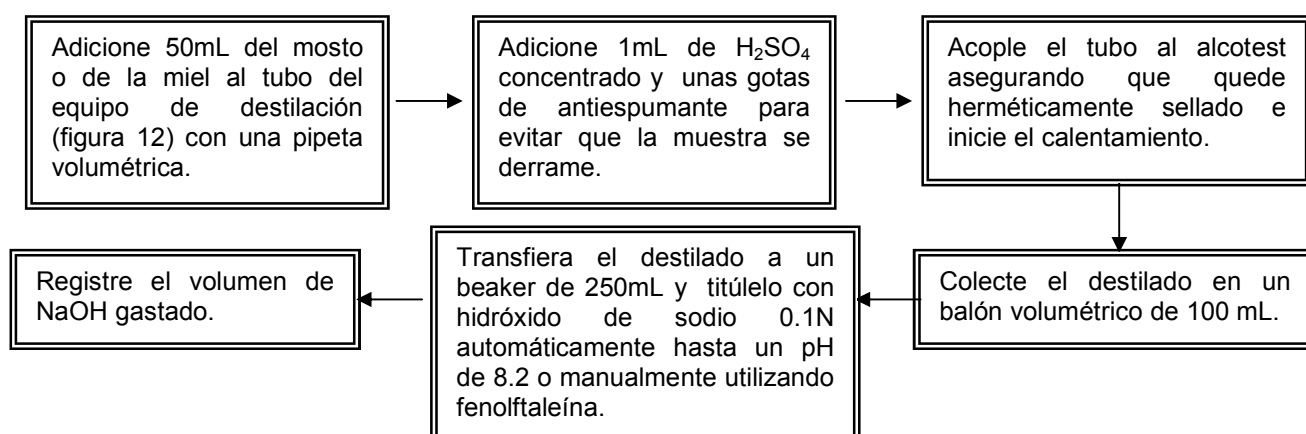
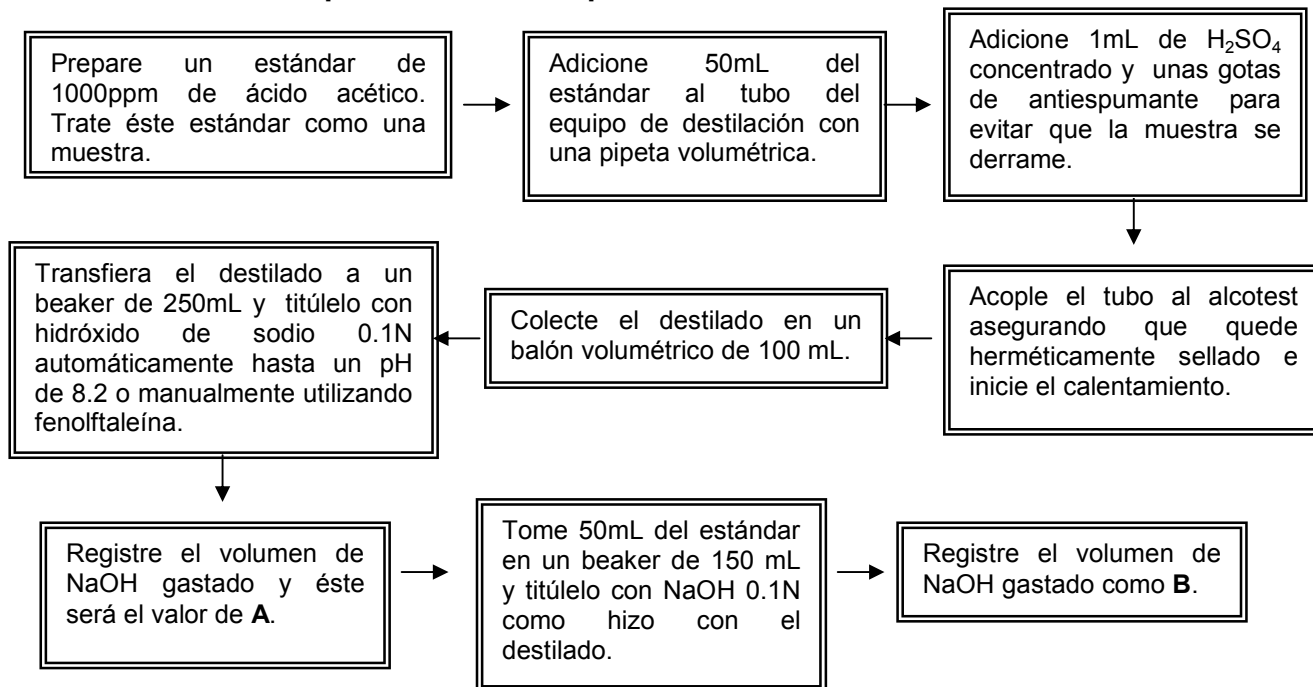


Figura 28. Diagrama para determinar el factor de recuperación del equipo de destilación por arrastre de vapor



Calcule el Factor de recuperación de la siguiente manera:

$$FR = A / B$$

Use este factor para calcular la acidez volátil en mieles o mosto fermentado en ppm.

$$\text{Acidez volátil (ppm)} = \frac{\text{Vol. NaOH} \times 0.1 \times 60000}{FR \times \text{Vol. Muestra tomada (50mL)}}$$

Donde,

0.1 = Normalidad de hidróxido de sodio

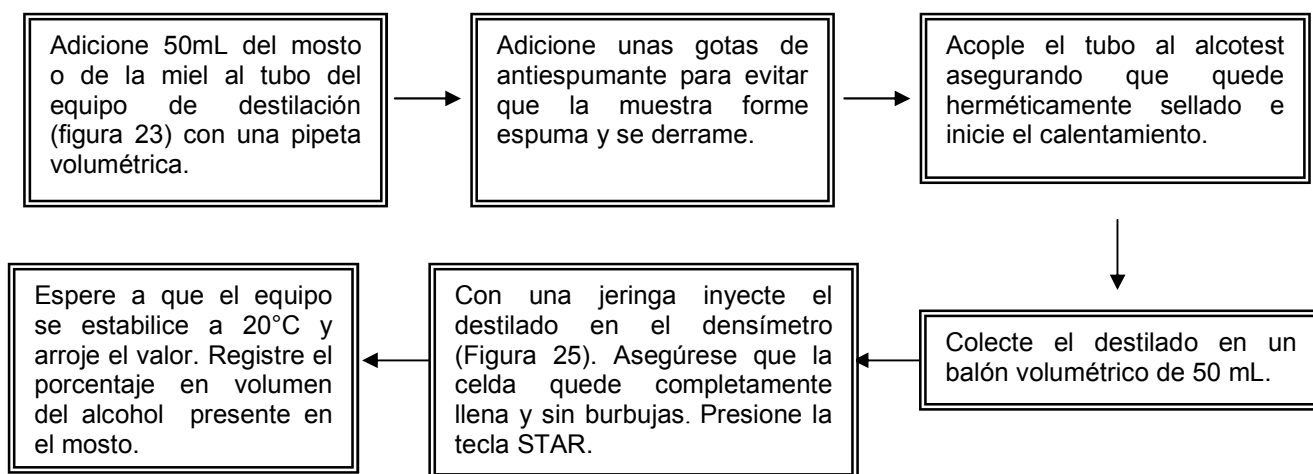
60000 = Peso molecular del ácido acético en miligramos

FR = Factor de recuperación del equipo de destilación (Usualmente está entre 0.55 y 0.7)

5.4.2 Determinación del porcentaje de alcohol en el mosto fermentado usando densímetro (6)

Debido a que el mosto fermentado es una mezcla de componentes el contenido de alcohol es separado por medio de una destilación y el destilado es medido utilizando un densímetro. En la figura 29 se describe el procedimiento a seguir.

Figura 29. Diagrama para determinar el porcentaje en volumen de alcohol en el mosto fermentado utilizando densímetro



5.4.3 Determinación y cuantificación de ácidos volátiles en mieles y mosto fermentado por cromatografía de gases

5.4.3.1 Tratamiento de la muestra Para extraer los ácidos volátiles presentes en la materia prima o en el mosto fermentado se realiza la destilación de la misma manera que se realizó en el método anterior con la diferencia que no se titula sino que se analiza por cromatografía de gases, una técnica más exacta y en donde se puede cuantificar individualmente cada ácido. Para éste método debemos tener factores de recuperación de cada ácido, los cuales se realizan de la misma manera como se realizó el del ácido acético (figura 29) pero preparando el patrón del respectivo ácido. En la tabla 10 se presenta los factores de recuperación del equipo de destilación para cada tubo.

Tabla 10. Factores de recuperación del equipo de destilación utilizado

ÁCIDO VOLÁTIL	TUBO 1	TUBO 2
ACIDO ACÉTICO	0.5919	0.5485
ACIDO PROPIÓNICO	0.7955	0.7582
ACIDO ISOBUTÍRICO	0.9574	0.9516
ACIDO BUTÍRICO	0.8992	0.8855
ACIDO ISOVALÉRICO	0.9752	0.9762
ACIDO VALÉRICO	0.9544	0.9522

A los 100mL del destilado se adicionan 10mL de HCl 0.1N y 10mL de diclorometano para extraer los ácidos, utilizando un balón de separación. Esta extracción es con el fin de no ingresar agua a la columna capilar (el agua es nociva para las columnas). La fase orgánica queda en la parte inferior; para separarla y evitar que pase cualquier gota de agua se utiliza un embudo en vidrio en forma de V que tenga una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, que es una sal inerte y absorbe el agua. El diclorometano con los ácidos se hace pasar por el embudo y se recogen en un balón volumétrico de 10mL, cuando pase todo el solvente orgánico se lava con unos cuantos mililitros de diclorometano limpio, se recogen en el mismo balón y se afora.

En un vial con tapa se transfiere 1.5mL de este extracto y se inyecta en el cromatógrafo de gases.

Para obtener el resultado final se realiza el siguiente cálculo:

$$(CG * 5)/FR \text{ ácido}$$

Donde,

CG: Concentración de cada ácido hallada por cromatografía de gases

5: Factor de dilución obtenido de dividir el volumen de muestra tomada y el volumen final de la extracción con diclorometano (50/10)

FR ácido: Factor de recuperación de cada ácido que depende del tubo en donde se realizó la destilación. (Ver figura 29)

5.4.3.2 Condiciones cromatográficas

Tabla 11. Condiciones cromatográficas empleadas

Columna	
Longitud de la columna	30 m
Temperatura inicial	45°C
Tiempo calentamiento inicial	5 min
Rata de temperatura	20°C/min
Temperatura final	100°C
Tiempo de calentamiento final	5 min
Tiempo total	15 min
Inyector	
Temperatura	240°C
Modo	Divisor
Rata de división	1:30
Volumen de inyección	1 µL
Detector	
Tipo	Ionización de llama
Temperatura	260°C
Gas de combustión	Hidrógeno (~40ml/min)
Gas oxidante	Aire (~400ml/min)
Make Up	Helio (~30ml/min)
Gas de Arrastre	
Tipo	Helio
Velocidad lineal	25cm/s

5.4.3.3 Curva de calibración Se realizó curva de calibración para los siguientes ácidos: ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico y ácido valérico.

Se preparó un patrón inicial con los seis ácidos, de allí se tomó los volúmenes para realizar las diluciones y formar 5 patrones cada uno con concentraciones diferentes de los ácidos y utilizando como solvente el diclorometano. En la tabla 12 se especifican las concentraciones de cada ácido en los diferentes patrones.

Tabla 12. Patrones de Ácidos volátiles

ACIDO	PATRON 1	PATRON 2	PATRON 3	PATRON 4	PATRON 5
ACÉTICO ppm	200	400	600	800	1000
PROPIONICO ppm	20	40	60	80	100
ISOBUTIRICO ppm	100	200	300	400	500
BUTIRICO ppm	10	20	30	40	50
ISOVALERICO ppm	10	20	30	40	50
VALERICO ppm	20	40	60	80	100

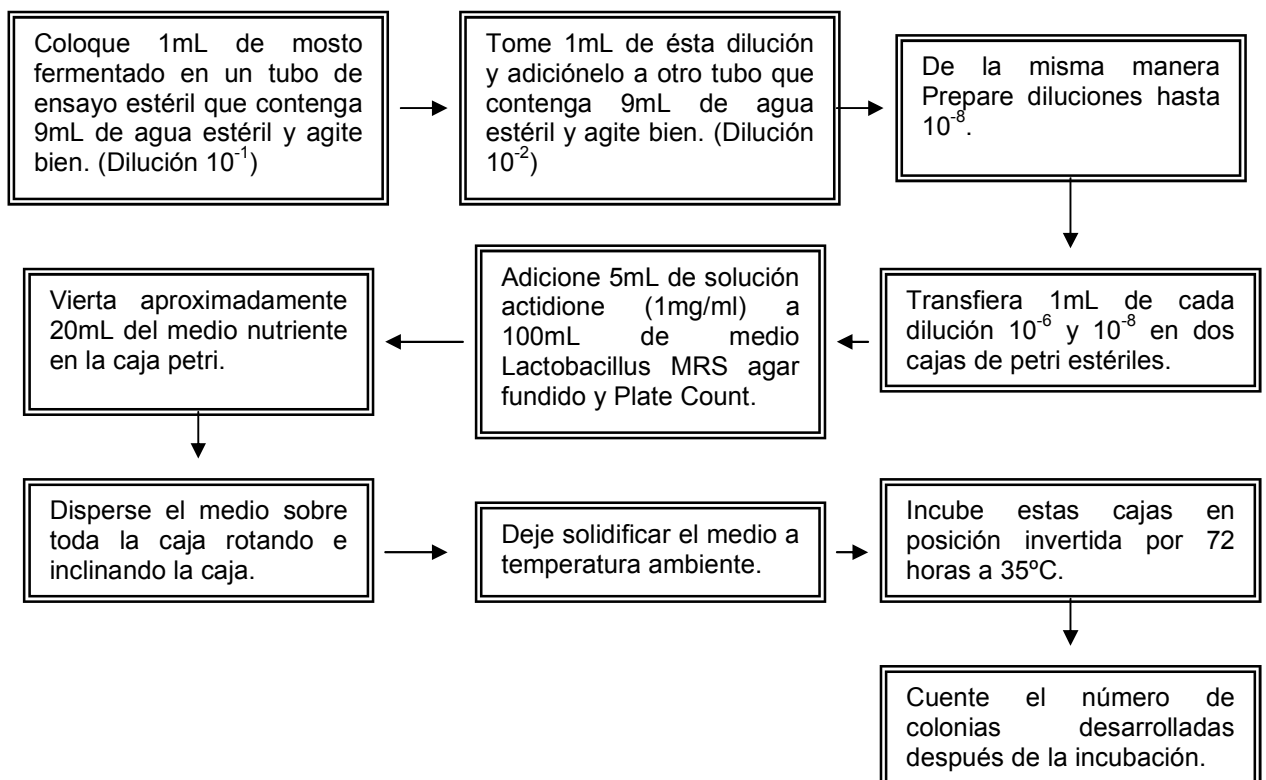
5.4.4 Análisis Microbiológicos Una vez tomadas las muestras se procede a realizar el cultivo microbiológico a partir de una dilución inicial de 10^{-1} la cual se logra tomando 1ml de la muestra y 9ml de diluyente que en nuestro caso es agua destilada estéril.

Una vez obtenida esta suspensión se procede a realizar diluciones secuenciales y para conseguirlo se debe disponer de varios tubos que contengan 9 ml de diluyente a los cuales se transfiere 1 ml de la dilución anterior. De esta forma y a partir de 10^{-1} se obtienen diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} hasta 10^{-8} .

Tradicionalmente se ha recomendado que con la finalidad de minimizar el error producido en los recuentos, todas las diluciones se deben sembrar por duplicado. Así mismo se deben realizar diluciones hasta 10^{-8} cuando no se conoce el grado de contaminación que pueda tener la muestra. (6)

Todos los procedimientos de microbiología deben ser realizados asépticamente, al frente de un mechero o en la cabina de flujo laminar. El nivel de dilución del mosto fermentado puede variar dependiendo del grado de contaminación. Usualmente una dilución de 10^{-8} es suficiente. (12)

Figura 30. Diagrama Recuento de bacterias por placa



Una vez preparadas las diluciones de las muestras y teniendo los medios de cultivo Agar Plate Count para mesófilos y Agar MRS para bacteria lácticas, se procede a realizar la siembra. Los medios empleados deben estar fundidos y enfriados a 45 – 50°C, se realiza la siembra inoculando 1 ml de cada dilución en las respectivas cajas de Petri y encima se agrega el medio. Una vez mezclado y solidificado se incuban a una temperatura de 35 °C por 48 a 72 horas. (6)

Luego del tiempo de incubación se procede a realizar el conteo de las colonias utilizando un cuenta colonias.

Se escogió la técnica de recuento en placa con siembra en profundidad ya que es la recomendada por Industrias PRAJ y la utilización de otras técnicas como la Filtración por Membrana se dificulta debido a la naturaleza de la materia prima. (6)

6. DATOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ACIDEZ VOLÁTIL TITULABLE EN MIELES Y MOSTO FERMENTADO EN TÉRMINOS DE ÁCIDO ACÉTICO O SALES DE ACETATO

A cada uno de los puntos críticos se les realizó un seguimiento de la acidez volátil total desde el primer día que inicia la fermentación hasta el final de la misma. Este tiempo depende de la planificación del producto del Ingenio Risaralda; la levadura puede durar hasta 2 meses seguidos produciendo alcohol efectivamente.

6.1.1 Tanque de alimentación (T-124) La acidez volátil en este tanque es muy variable, todo depende del tipo de caña que entra a molinos, del tiempo de permanencia en patios, de las condiciones climáticas, de la utilización de madurantes, etc. Lo ideal es que ésta variable esté siempre menor de 2500ppm para que no afecte el proceso de fermentación.

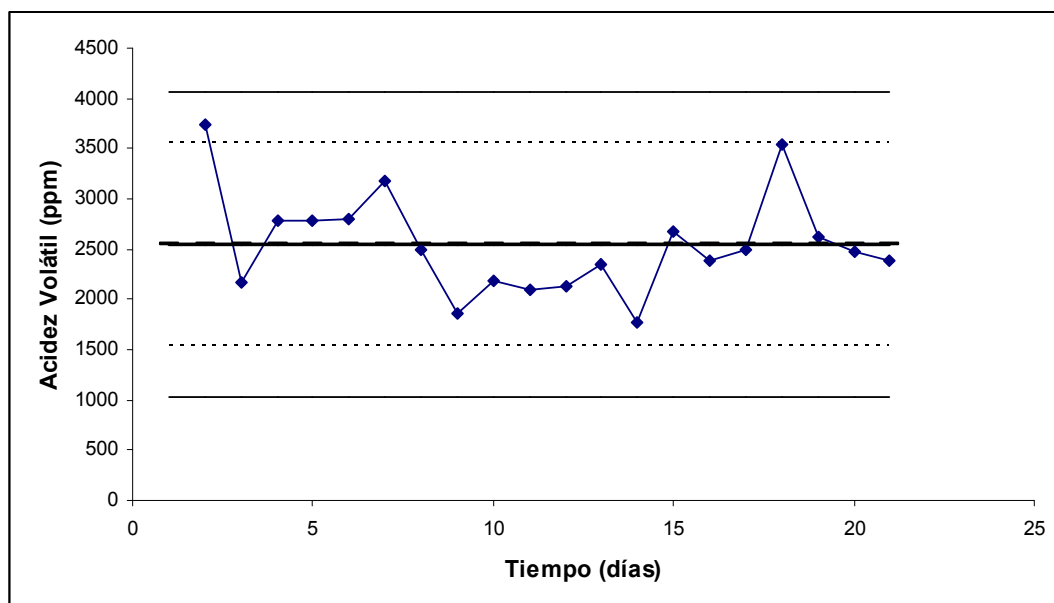
En la tabla 13 se puede observar la acidez volátil total en términos de ácido acético que suministra la materia prima del Ingenio Risaralda al proceso de fermentación desde el inicio hasta el final del cultivo que en este caso fueron 20 días.

Tabla 13. Resultados de la Acidez volátil en la materia prima

Día	AV (ppm)	Día	AV (ppm)	Día	AV (ppm)
1	3735.3	8	2192.83	15	2379.01
2	2176.54	9	2192.83	16	2496.71
3	2788.09	10	2094.82	17	3547.71
4	2804.28	11	2136.47	18	2628.68
5	3186.03	12	2355.23	19	2479.47
6	2502.21	13	1767.91	20	2380.76
7	1861.01	14	2676.24		

PROMEDIO	2548.9
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	504.86
LÍMITE DE ACCIÓN SUPERIOR	3558.63
LÍMITE DE ALERTA SUPERIOR	4063.49

Gráfico 1. Curva de control acidez volátil en la materia prima



En el gráfico 1 el límite de acción corresponde al promedio ± 2 veces la desviación estándar y el límite de alerta ± 3 veces la desviación estándar. En él se observa que la acidez volátil en la materia prima en ocasiones pasa el límite de acción incrementado la concentración de ácidos volátiles en el proceso de fermentación y posiblemente afectando la productividad del proceso pero en este caso todavía se puede controlar con la adición de antibiótico y disminución del pH. Si pasa el límite de alerta este material no se debe de ingresar porque podría afectar el proceso gravemente.

En el primer día se tiene una alta concentración de AVT¹ debido a que en el arranque solo se utiliza Miel de segunda extracción para la alimentación pues es el único material que se puede dejar almacenado y así iniciar la propagación al mismo tiempo con la fábrica de azúcar. En los días siguientes ya se alimenta con una mezcla de miel segunda y jugo clarificado bajando la concentración de estos ácidos orgánicos.

En el gráfico 1 también se puede observar que el valor de la desviación estándar es alto debido a que son muchos los factores que influyen sobre éste parámetro tales como tipo de caña que entra a molinos, del tiempo de permanencia en patios, de las condiciones climáticas, entre otros y que finalmente el proceso de fermentación debe resistir, por tal razón en el área de fermentación cuando el incremento de la acidez volátil es muy alto utilizan antibióticos para contrarrestar la contaminación que está entrando en la materia prima y evitar que se incremente la acidez volátil asociada a esta contaminación.

¹ AVT: Acidez volátil total

6.1.2 Fermentadores R311 y R312 Debido a que estos dos tanques presentan condiciones anaeróbicas similares se observa un igual comportamiento de la acidez volátil. A medida que transcurre el tiempo la AVT aumenta progresivamente.

El objetivo central en los fermentadores es mantener un porcentaje de alcohol óptimo que no afecte a la levadura pero que sí aumente la eficiencia de la planta. Para lograr este objetivo se debe controlar la acidez volátil en estos tanques pues un aumento de ésta variable incrementa la presión osmótica generando estrés y mortalidad en la levadura e interrumpe la producción de alcohol, bajando el rendimiento de la planta. Esto se ve claramente en el gráfico 2, cuando la AVT pasa el límite de acción, el porcentaje de alcohol empieza a descender y a medida que aumenta y pasa el límite de alerta el descenso es mucho más fuerte y muy difícil de recuperar. En este caso es conveniente reforzar los tanques con levadura nueva o iniciar con un cultivo nuevo.

Gráfico 2. Curvas de control acidez volátil en los fermentadores 1 y 2

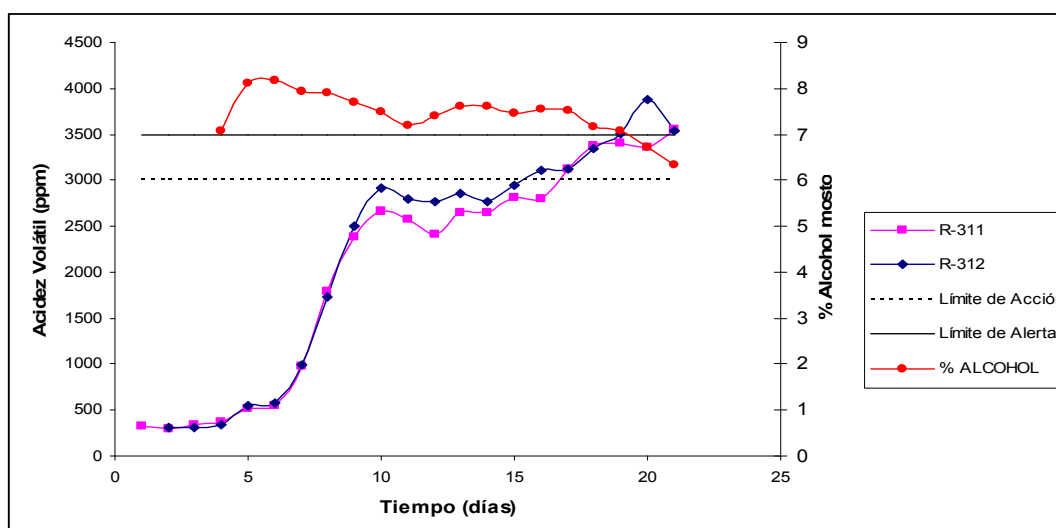


Tabla 14. Resultados de la Acidez Volátil de los fermentadores vs porcentaje de alcohol en el mosto fermentado

Tiempo (Días)	AV R-311 (ppm)	AV R-312 (ppm)	Alcohol mosto (%v/v)
4	369.45	337.74	7.07
5	520.89	549.43	8.10
6	549.48	570.58	8.17
7	981.26	996.49	7.93
8	1784.72	1731.07	7.90
9	2387.65	2502.06	7.70
10	2666.44	2918.78	7.50
11	2579.86	2794.2	7.20
12	2410.85	2775.15	7.40
13	2652.89	2862.45	7.60
14	2648.29	2761.42	7.60
15	2805.5	2941.52	7.47
16	2794.69	3113.53	7.55
17	3125.28	3125.86	7.53
18	3375.85	3344.68	7.15
19	3399.94	3508.93	7.07
20	3363.13	3874.93	6.73
21	3552.63	3541.99	6.33
PROMEDIO	2044.63	2136.26	7.44
DES. ESTÁNDAR	1205.14	1310.87	0.47
LÍMITE DE ACCIÓN	3000	3000	NA
LÍMITE DE ALERTA	3500	3500	NA

La acidez volátil es una medida indirecta de la contaminación por lo tanto se podría hacer una comparación con la curva de crecimiento de los microorganismos (figura 6). En el gráfico 2 se observa que los cinco primeros días las bacterias están adaptándose al medio, se encuentran inactivas y de allí en adelante se activan e inician su metabolismo consumiendo azúcares para generar ácidos volátiles, poco a poco estos ácidos se van acumulando en el medio hasta que llegan a un punto que es perjudicial para la levadura alrededor de 3500ppm afectando la producción de alcohol.

6.1.3 Tanque Activación de levadura R-305 Como su nombre lo indica el objetivo de este tanque es activar nuevamente la levadura después de haber realizado su trabajo en los fermentadores, debido a que en la destilería del Ingenio Risaralda se recircula levadura.

Es un sistema aeróbico, se suministra aire y nutrientes para garantizar su reproducción y eliminar su estrés. En este medio también hay presencia

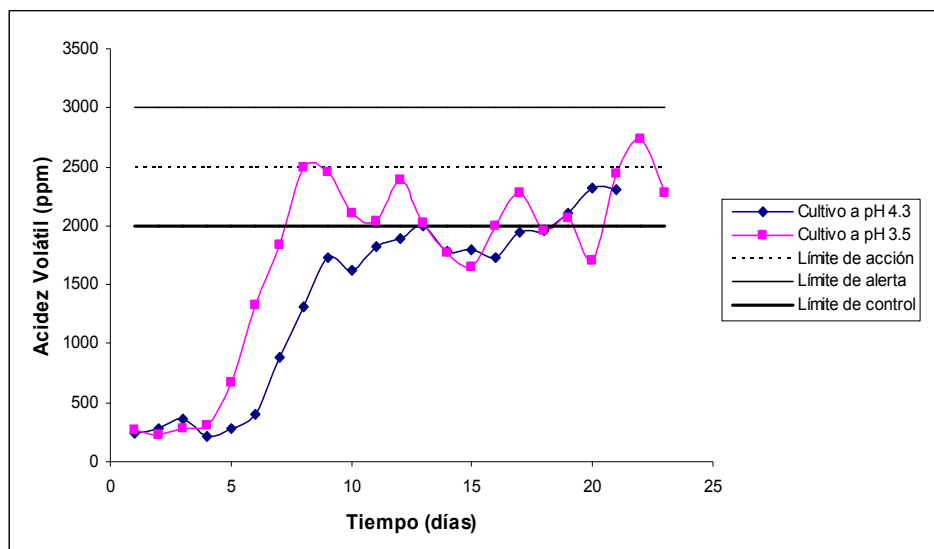
bacteriana; la acidez volátil también aumenta a medida que pasa el tiempo. En este tanque es donde se adiciona la mayor concentración de antibióticos ya que las bacterias tienden a reproducirse a mayor velocidad en estas condiciones. En la tabla 15 se pueden observar los resultados de acidez volátil de un cultivo que se mantuvo a un pH de 4.3 y otro cultivo a pH 3.5.

Este cambio de pH se realizó con el fin de disminuir la población bacteriana y así controlar la acidez volátil en este tanque. La levadura es capaz de soportar pH's bajos alrededor de 2.5 al contrario las bacterias no lo soportan y mueren.

Tabla 15. Resultados de la Acidez volátil del tanque de activación de levadura a diferentes pH

Tiempo (Días)	AV R-305 a pH 4.3 (ppm)	AV R-305 a pH 3.5 (ppm)
1	241.63	263.14
2	278.93	223.39
3	363.38	286.56
4	217.64	314.45
5	286.02	666.07
6	403.42	1323.00
7	888.68	1843.51
8	1319.22	2496.01
9	1728.64	2454.85
10	1629.31	2105.52
11	1819.73	2037.22
12	1885.56	2381.69
13	2001.47	2026.55
14	1783.24	1769.23
15	1797.76	1652.11
16	1731.96	1991.84
17	1940.37	2279.93
18	1952.93	1964.16
19	2104.05	2068.43
20	2315.24	1702.77
21	2305.52	2437.68
PROMEDIO	1380.70	1632.77
DES. ESTÁNDAR	763.74	791.53
LÍMITE DE CONTROL	2000	2000
LÍMITE DE ACCIÓN	2500	2500
LÍMITE DE ALERTA	3000	3000

Grafico 3. Acidez volátil total en el tanque de activación de levadura



Del gráfico 3 se puede decir que tanto el cultivo a pH 4.3 como el de pH 3.5 tienen comportamientos similares. En los primeros días los ácidos orgánicos van aumentando su concentración progresivamente hasta que se llega a una concentración máxima en el día 13 y de allí empieza a oscilar. Esta oscilación es debida a la materia prima que entra, a la adición de antibiótico, a la contaminación que se genera en el medio y a la cantidad de vinaza y levadura recirculada.

6.1.4 Vinaza Recirculada T-403 La vinaza es otra entrada al proceso de fermentación, el mosto fermentado del T-335 entra a la columna mostera C-401 (Columna de destilación) y allí es destilado separándose el alcohol de los demás componentes, lo que queda en el fondo de esta columna es vinaza entre 5 a 10 °Brix, de allí se envía al tanque flash T-403 donde ocurre una evaporación quedando de 13 a 16 °Brix. Se enfría por medio de un intercambiador de calor y una parte se recircula en fermentación y la otra parte se envía al flubex (Equipo para concentrar la vinaza) donde se concentra mucho más para ser utilizado en compostaje.

Dependiendo de la acidez volátil que tengan los fermentadores se recircula o no vinaza ya que ésta es una fuente grande de ácidos volátiles. Después de 3500 ppm de AVT en los fermentadores se disminuye la recirculación de vinaza, comúnmente éste porcentaje se maneja en 50% del total de vinaza producida en destilación. Si se observa que la concentración de estos ácidos aumenta a gran velocidad se disminuye del todo la recirculación de vinaza y se envía a compostaje.

Gráfico 4. Comportamiento de la AVT de la vinaza recirculada en el proceso de fermentación

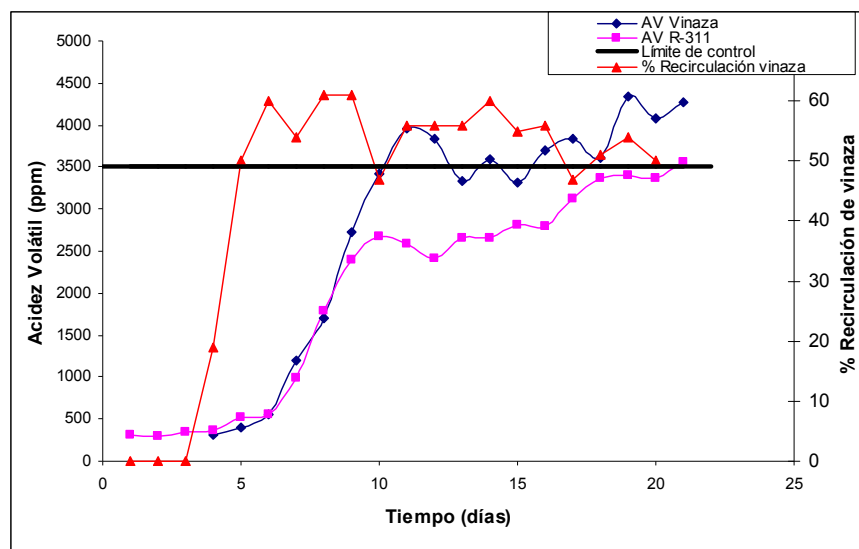


Tabla 16. Datos de acidez volátil y porcentaje de recirculación de vinaza

Tiempo (Días)	AV Vinaza (ppm)	% Recirculación de vinaza
4	307.61	19
5	396.17	35
6	549.68	40
7	1199.74	54
8	1696.87	61
9	2720.83	61
10	3415.83	47
11	3956.38	56
12	3844.91	56
13	3330.69	56
14	3600.61	60
15	3319.44	55
16	3690.59	56
17	3830.07	47
18	3615.47	51
19	43338.3	54
20	4077.96	50
21	4264.94	24
PROMEDIO		NA
DES. ESTÁNDAR		NA
LÍMITE DE CONTROL		NA

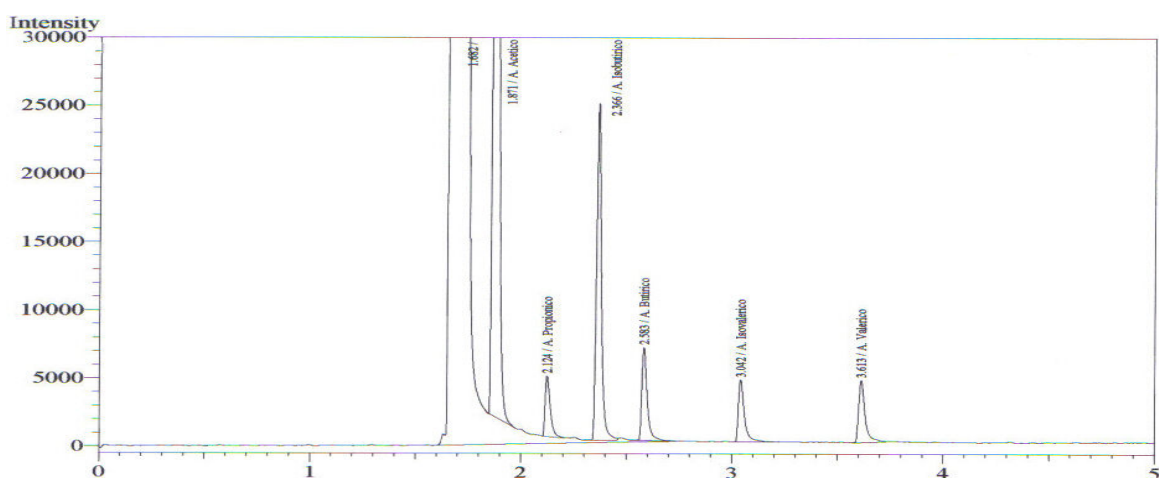
En la gráfica 4 se puede observar el comportamiento de AVT de la vinaza y del fermentador R-311 (Tabla 14) como también el porcentaje de recirculación de vinaza que se envía al área de fermentación. Se puede observar que a medida que pasa el tiempo el porcentaje de recirculación aumenta al igual que la acidez. El porcentaje máximo que se ha manejado es 61%. Debido a que la vinaza sufre un proceso de evaporación antes de entrar nuevamente a los fermentadores la acumulación de ácidos orgánicos es mucho mayor que en los fermentadores. Por tal razón se debe tener un control en el porcentaje de recirculación en caso que la acidez en los fermentadores aumente porque es una fuente rica en ácidos volátiles.

6.2 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

6.2.1 Condiciones cromatográficas óptimas Como principal referencia bibliográfica para la cuantificación de los ácidos volátiles por cromatografía de gases teníamos el método G-2 del manual de análisis de la industria Praj (Determinación de ácidos volátiles en materias primas o mosto fermentado por el método de cromatografía de gases). En éste método utilizan un cromatógrafo de gas Hewlett Packard serie 5890 equipado con detector de ionización de llama y módulo químico Alltech Allchrome y una columna capilar de silica fundida BP 21, SGE de 25mm x 0.5mm de diámetro y 0.5 micras de espesor. (6) Debido a que el Ingenio Risaralda tiene un cromatógrafo de gas y una columna capilar diferente lo primero que se realizó fue investigar que condiciones eran las más apropiadas en este nuevo equipo.

Con un patrón que contenía una mezcla de los seis ácidos disueltos en etanol se evaluó las condiciones de operación dadas por el método de Praj como son la temperatura del inyector, del horno y del detector, el flujo de gas de arrastre y el tipo de gas.

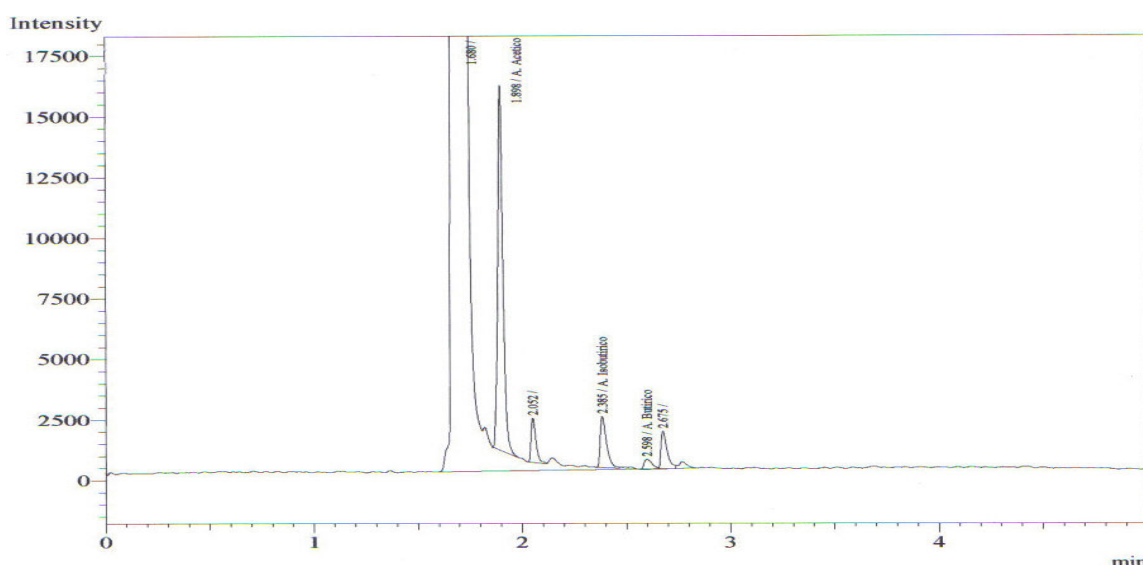
Figura 31. Cromatograma de un estándar con los seis ácidos en etanol



En el cromatograma que se presenta en la figura 31 se ve claramente siete picos que corresponde a los seis ácidos y al solvente que en este caso era etanol. Se identificó cada pico con su respectivo tiempo de retención y se realizó la curva de calibración con estas condiciones cromatográficas obtenidas. El primer pico que corresponde al etanol interfiere con el pico del ácido acético. No se muestra buena separación además los demás picos quedan muy cerca de los otros.

Con el tratamiento de las muestras problemas se tuvo dificultades. De acuerdo a la preparación de la muestra que indica éste método G-2 se tomaba 5ml del destilado de los ácidos orgánicos que se obtienen en el procedimiento de la figura 13 y se afora en un balón de 10mL con etanol. De allí se toma en un vial 1.5mL y se inyecta en el cromatógrafo. Esto implicaba el ingreso de agua a la columna. Con este tratamiento de muestra se empezó a obtener cromatogramas del tipo que se presentan en la figura 32, donde la separación no era bien definida y se observa que la presencia del agua en la columna presenta interferencia en la resolución de los picos y las colas que se generan en algunos picos afectan la integración y cuantificación de los ácidos.

Figura 32. Cromatograma de una muestra problema diluida en etanol



No siendo aplicable ésta técnica en el Ingenio Risaralda se acudió a expertos en el tema como es el director del Laboratorio de Calidad de Productos Naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira José Hipólito Isaza Martínez Ph.D. y se le planteó el problema. De allí lo más importante era mejorar el tratamiento de la muestra debido a que nuestra columna no tolera el agua. Se pensó en una extracción líquido-líquido de los ácidos con un solvente orgánico que no interfiriera en la separación; el más adecuado y que estaba a nuestro alcance era el diclorometano. Los ácidos quedan en la fase orgánica y se elimina por completo el

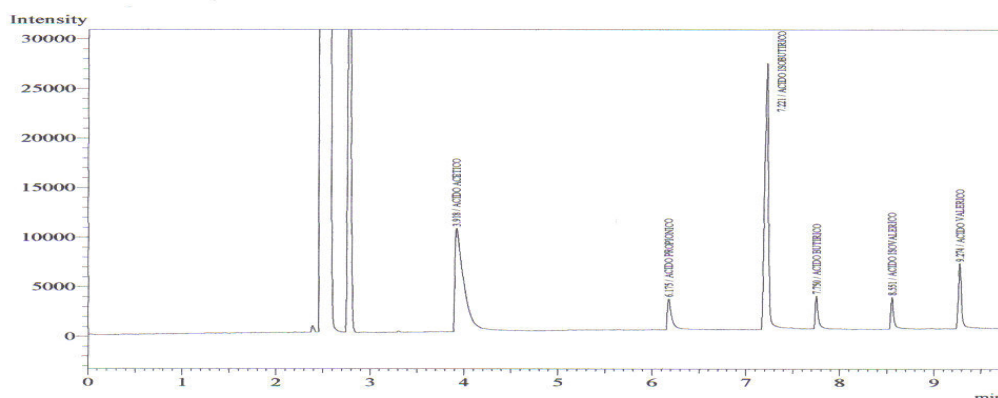
agua. Ya con este nuevo tratamiento de muestra se evaluaron nuevamente las condiciones de operación y se crearon nuevas curvas de calibración. Los detalles y resultados de este estudio se presentan en los numerales siguientes.

6.2.2 Identificación Para determinar el tiempo de retención de cada ácido se preparó un patrón de 500ppm por cada uno, utilizando como solvente diclorometano y se inyectó por separado; con el cromatograma de cada ácido se pudo esclarecer el tiempo de retención de los ácidos en estudio. Posteriormente para tener mayor seguridad en estos tiempos de retención se preparó un patrón con la mezcla de los seis ácidos y se inyectó varias veces, en cada inyección que se realizaba se enriquecía un ácido diferente por lo tanto el área del pico del ácido enriquecido aumentaba y con esto aseguramos que realmente este era el ácido que estaba a prueba. En la tabla 17 se observa el tiempo de retención encontrado de cada ácido utilizando como solvente diclorometano y en la figura 33 se observa el cromatograma del patrón que contenía la mezcla de ácidos bajo las condiciones cromatográficas indicadas en el numeral 4.5.2.2. En él se ve claramente que los primeros picos que corresponden al diclorometano no interfieren para nada con los picos de interés, además hay buena separación entre ellos mismos.

Tabla 17. Tiempo de retención de los ácidos orgánicos por cromatografía de gases

ÁCIDOS VOLÁTILES	TIEMPOS DE RETENCIÓN (min)
Acido Acético	3.918
Ácido Propiónico	6.175
Ácido Isobutírico	7.221
Ácido Butírico	7.750
Ácido Isovalérico	8.551
Ácido Valérico	9.274

Figura 33. Cromatograma de un estándar con los seis ácidos en diclorometano

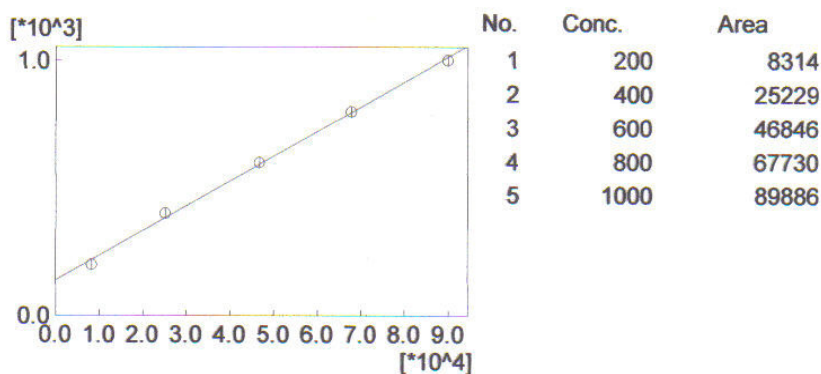


6.2.3 Curva de calibración Bajo las condiciones cromatográficas descritas en el numeral 4.5.2.2 y con los patrones preparados de acuerdo al numeral 4.5.2.3 se obtuvo seis curvas de calibración correspondientes a cada ácido. En la figura 34 se observan las diferentes curvas que se utilizaron en la cuantificación de los ácidos volátiles obtenidas directamente del cromatógrafo con su respectivo coeficiente de correlación.

Figura 34. Curvas de calibración de los ácidos volátiles en estudio

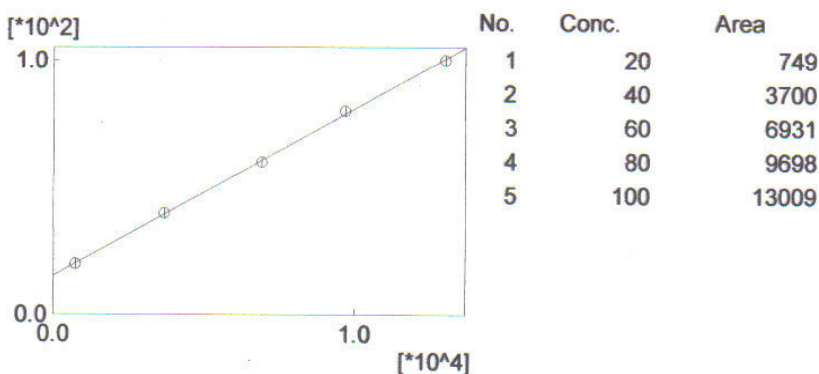
ID#:1 Nombre:ACIDO ACETICO

$f(x)=9.70538846327e-003*x+138.014204722$
 $R=0.998966309765$ $R^2=0.997933688045$
 Tipo de curva:Lineal



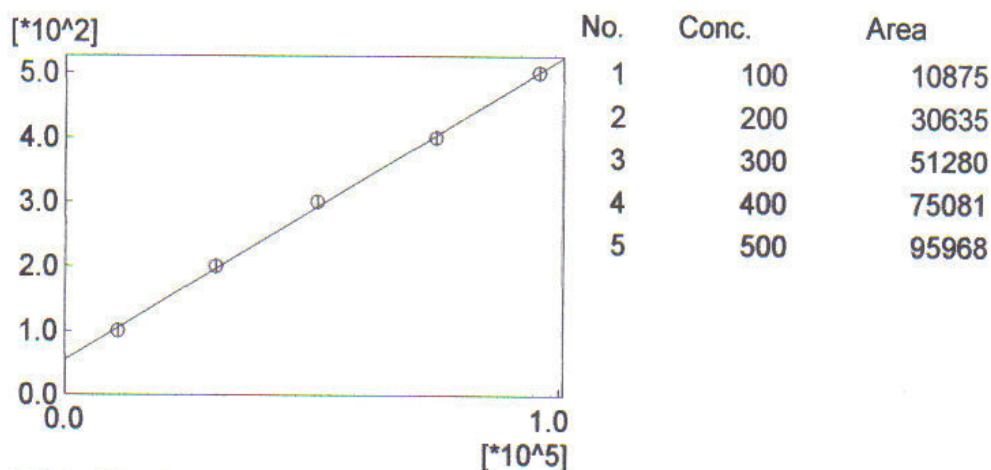
ID#:2 Nombre:ACIDO PROPIONICO

$f(x)=6.54982281453e-003*x+15.3467683115$
 $R=0.999701009862$ $R^2=0.999402109119$
 Tipo de curva:Lineal



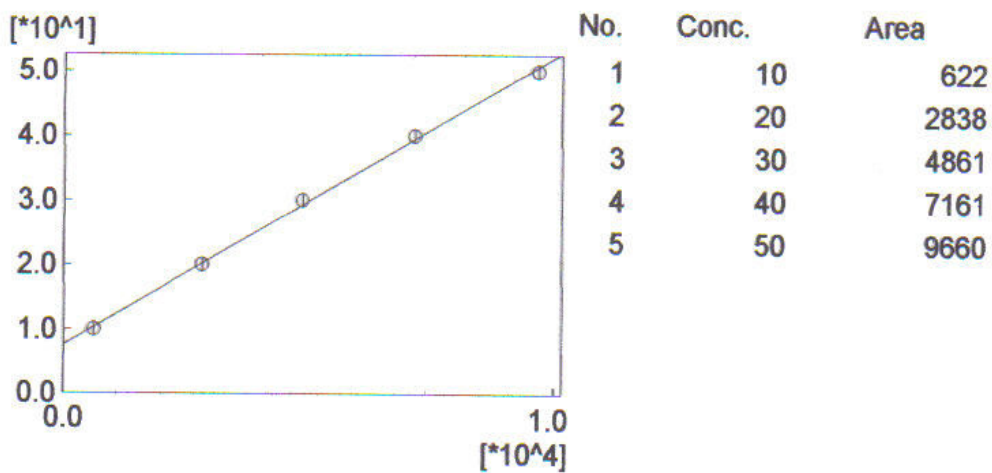
ID#:3 Nombre:ACIDO ISOBUTIRICO

$f(x)=4.65456378552e-003*x+54.3881556436$
 $R=0.999508903765$ $R^2=0.999018048705$
 Tipo de curva:Lineal



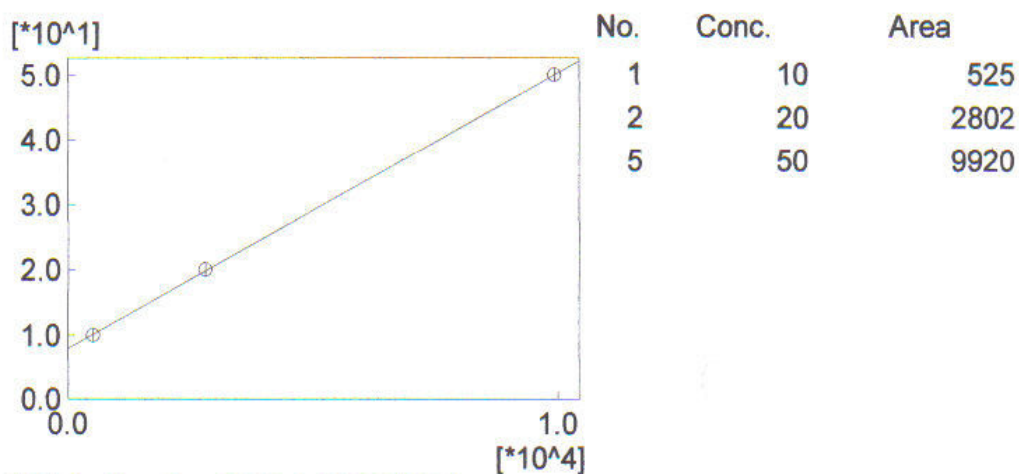
ID#:4 Nombre:ACIDO BUTIRICO

$f(x)=4.45825370627e-003*x+7.58184477587$
 $R=0.999298831551$ $R^2=0.998598154739$
 Tipo de curva:Lineal



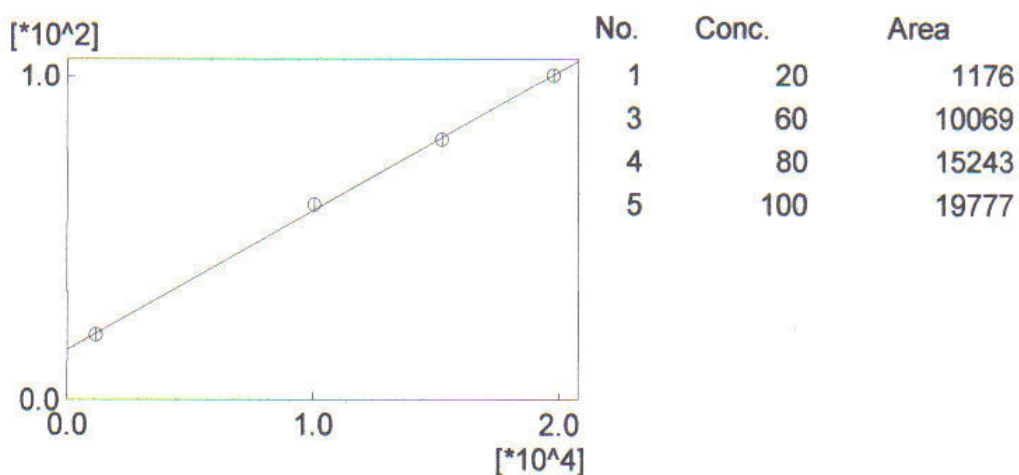
ID#:5 Nombre:ACIDO ISOVALERICO

$f(x)=4.2472178181e-003*x+7.91166320356$
 $R=0.999966185643$ $R^2=0.99993237243$
 Tipo de curva:Lineal



ID#:6 Nombre:ACIDO VALERICO

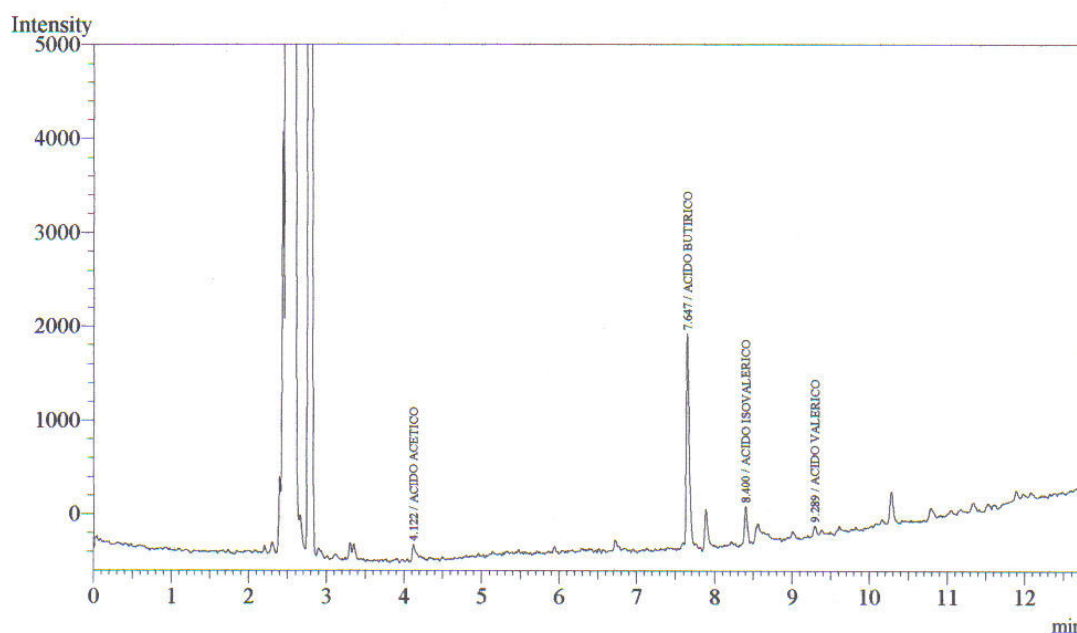
$f(x)=4.27753939157e-003*x+15.5245713494$
 $R=0.999596080166$ $R^2=0.999192323483$
 Tipo de curva:Lineal



6.2.4 Cuantificación de los ácidos volátiles en el proceso de fermentación

6.2.4.1 Tanque de alimentación (T-124) En la figura 35 se observa un cromatograma correspondiente a una de las muestras que se analizaron, en el cual se puede identificar cuatro de los ácidos en estudio y otros compuestos desconocidos para nosotros que generaron las bacterias en el transcurso del proceso de producción de azúcar.

Figura 35. Cromatograma de una muestra en estudio del T-124



Durante el tiempo de desarrollo del cultivo (20 días) se estudió el comportamiento de cada ácido en la materia prima que ingresaba al área de fermentación. En la tabla 18 se puede visualizar la concentración de cada ácido durante el tiempo de producción y en el gráfico 5 se ilustra claramente el comportamiento de cada ácido durante el tiempo de desarrollo del cultivo.

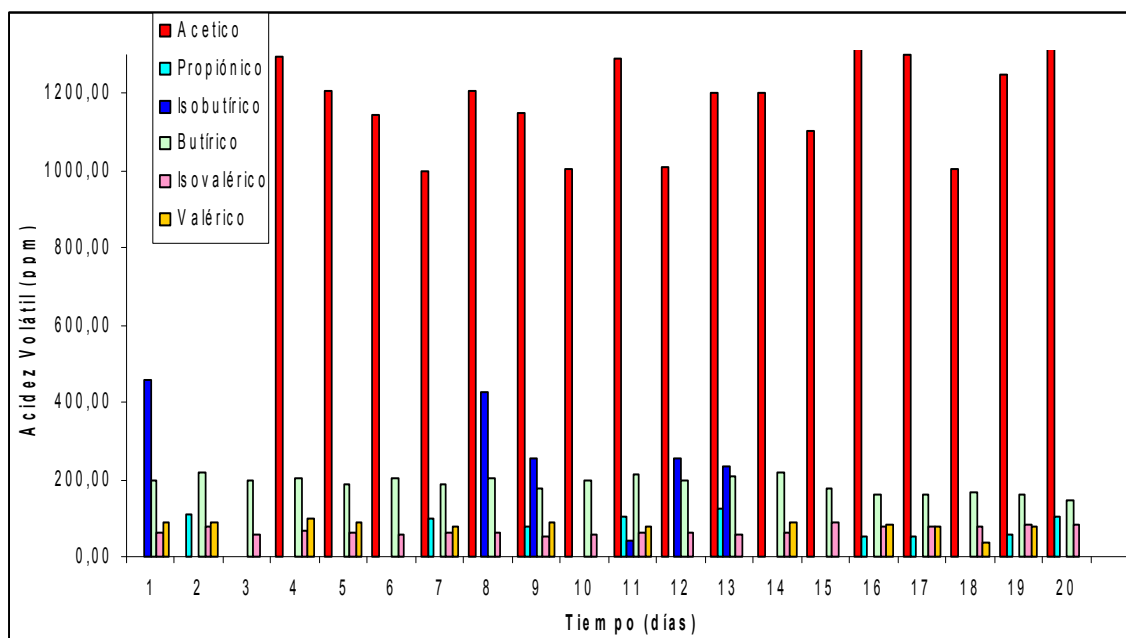
De acuerdo al gráfico 5 el ácido que se presenta en mayor concentración en la materia prima es el acético el cual a partir del cuarto día entra a hacer parte de la acidez volátil total. Los ácidos butírico e isovalérico se encuentran en menor concentración desde el primer día de la alimentación y siempre están presentes, hacen parte de ella. El propiónico, isobutírico y valérico no son constantes, aparecen los días en que la contaminación en la materia prima es alta, cuando se ha tenido problemas en la fábrica de azúcar o se alimenta solo con miel de segunda extracción.

Tabla 18. Concentración de cada ácido volátil en la materia prima comparado con la acidez total obtenida por titulación

Tiempo (Días)	Acético (ppm)	Propiónico (ppm)	Isobutírico (ppm)	Butírico (ppm)	Isovalérico (ppm)	Valérico (ppm)	Σ AV x CG (ppm)	AVT (ppm)	% AV x CG
1	ND	ND	456.08	196.94	62.96	86.15	802.13	2103.50	38
2	ND	106.98	ND	217.85	77.47	86.60	488.23	1883.48	26
3	ND	ND	ND	200.18	57.22	ND	257.40	1719.35	15
4	1296.62	ND	ND	203.09	66.82	87.84	1654.37	2050.27	81
5	1207.16	ND	ND	187.82	61.42	87.69	1544.09	2376.75	65
6	1143.85	ND	ND	201.35	59.63	ND	1404.83	2147.39	65
7	1005.23	98.45	ND	189.75	60.12	75.42	1428.97	2348.68	60
8	1204.56	ND	425.78	200.58	63.47	ND	1894.39	2227.70	85
9	1148.48	75.69	256.45	178.93	52.41	89.62	1801.58	2541.29	70
10	ND	ND	ND	196.45	55.61	ND	252.06	1768.18	70
11	1289.45	104.12	432.83	213.76	62.41	78.32	2180.89	3318.90	54
12	1008.19	ND	256.89	198.45	64.23	ND	1527.76	2421.15	63
13	1201.64	124.93	231.76	206.95	57.46	ND	1822.74	3029.87	60
14	1200.41	ND	ND	216.62	62.48	88.39	1567.9	2299.41	68
15	1104.06	ND	ND	159.37	86.53	ND	1349.96	2074.26	66
16	1345.89	54.32	ND	162.41	78.32	81.42	1722.36	2577.68	66
17	1298.97	53.41	ND	160.43	80.23	78.48	1671.52	2585.0	64
18	1004.57	ND	ND	65.78	79.16	35.46	1184.97	1902.14	67
19	1245.63	57.49	ND	159.47	82.15	76.34	1621.08	2518.09	64
20	1354.85	104.79	ND	145.89	84.56	ND	1690.09	2797.19	60
X	1179,8	86,7	278,5	189,1	67,7	80,1	1430,3	2334,5	60.7

ND: No detectable

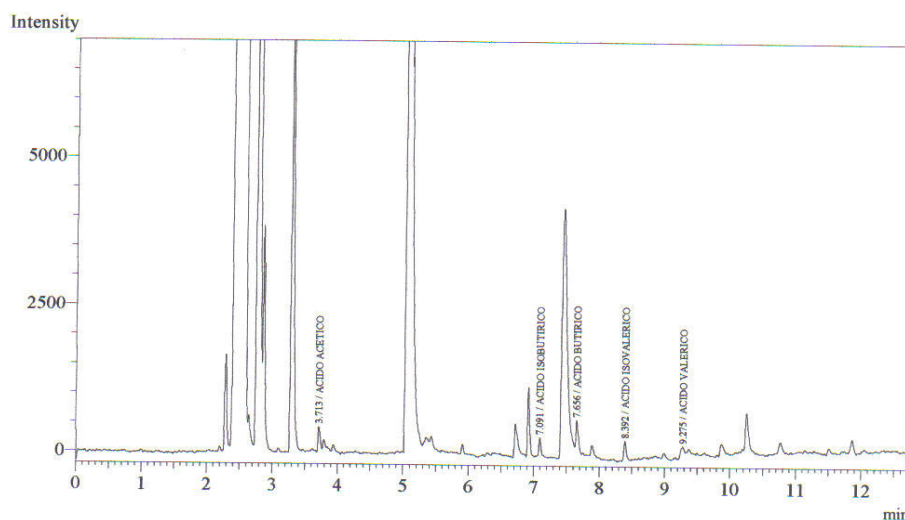
Grafico 5. Comportamiento de cada ácido volátil en la materia prima durante el tiempo de desarrollo del cultivo



Comparando la acidez volátil determinada por cromatografía de gases y la obtenida por titulación se tiene que ésta primera es el 61% de la acidez total. El resto de porcentaje es debido a la presencia de otros ácidos como el láctico, succínico, málico y demás que no se pueden determinar por CG debido a que se descomponen a altas temperaturas por lo tanto se deben determinar por HPLC.

6.2.4.2 Fermentador R-311 La figura 36 ilustra un cromatograma de una de las muestras del fermentador R-311 en estudio y donde se refleja la presencia de cinco de los ácidos y otros compuestos desconocidos generados por las bacterias que entraron con la materia prima y las que han crecido durante el transcurso del cultivo. En la tabla 19 se encuentran las concentraciones de cada ácido comparada con la obtenida por titulación de una muestra puntual cada 24 horas.

Figura 36. Cromatograma de una muestra en estudio del fermentador R-311



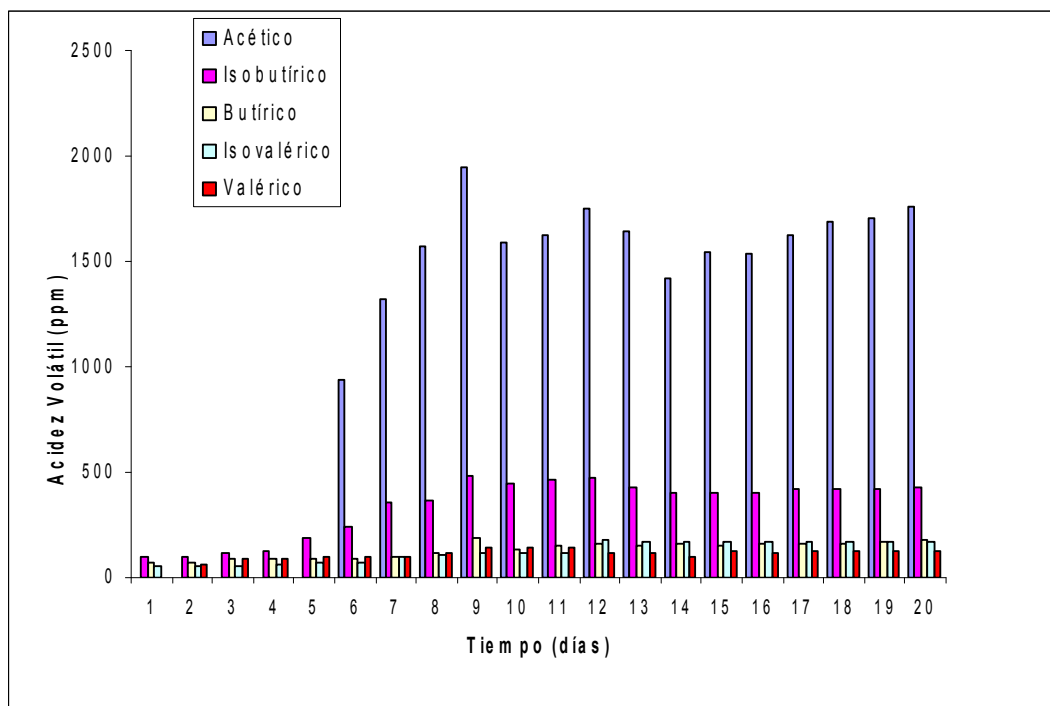
De acuerdo a lo que se observa en el gráfico 6 en el fermentador R-311 el ácido acético es el de mayor concentración y sólo a partir del sexto día se detecta en el tanque y el día noveno es donde tiene su máxima concentración debido a que este día la contaminación está alta. Los ácidos isobutírico, butírico e isovalérico se encuentran desde el primer día de cultivo como se pudo ver en el numeral anterior, vienen desde la materia prima. El isobutírico a través del tiempo va aumentando su concentración y en el noveno día también llega a su concentración máxima y de allí en adelante permanece constante. El butírico y el isovalérico están en concentraciones bajas todo el tiempo. El valérico aparece en el segundo día y también se mantiene durante todo el proceso en concentraciones bajas. El ácido propiónico no se detecta en este fermentador ningún día.

Tabla 19. Concentración de cada ácido volátil en el fermentador R-311

Tiempo (Días)	Acético (ppm)	Isobutírico (ppm)	Butírico (ppm)	Isovalérico (ppm)	Valérico (ppm)	Σ AV x CG (ppm)	AVT (ppm)	% AV x CG
1	ND	96,25	72,59	53,21	ND	222,05	295.87	75
2	ND	102,6	71,96	56,26	66,39	297,21	294.99	100
3	ND	118,8	89,41	55,22	91,57	355,00	373.5	95
4	ND	121,45	89,36	60,77	93,31	364,89	348.88	104
5	ND	190,45	90,45	70,13	98,9	449,93	619.25	72
6	938,46	241,36	91,58	70,02	97,62	1439,04	1638.62	87
7	1325,87	354,12	102,45	95,63	98,47	1976,54	3461.76	62
8	1568,49	362,15	114,89	104,56	113,28	2263,37	4143.12	54
9	1945,62	478,26	184,26	120,36	145,36	2873,86	5066.90	56
10	1589,47	450,12	132,45	118,65	139,45	2430,14	3436.92	70
11	1623,41	462,13	152,45	120,49	140,23	2498,71	4058.04	61
12	1745,69	471,23	162,54	174,26	120,45	2674,17	4577.76	58
13	1645,23	431,56	150,32	170,78	119,45	2517,34	4125.63	61
14	1423,89	398,78	164,25	167,62	102,56	2257,10	3965.41	56
15	1548,96	401,23	154,26	171,48	122,96	2398,89	4235.78	56
16	1532,45	399,45	160,45	167,96	118,42	2378,73	4159.89	57
17	1623,78	415,26	163,45	170,45	123,48	2496,42	4352.16	57
18	1685,45	416,89	162,78	169,21	122,66	2556,99	4617.85	55
19	1703,54	422,33	166,23	172,45	125,45	2590,00	4812.62	53
20	1756,55	425,12	174,56	173,21	128,49	2657,93	4956.13	53
X	1577,1	338,0	132,5	123,1	114,1	1884,9	3162.2	67

ND: No Detectable

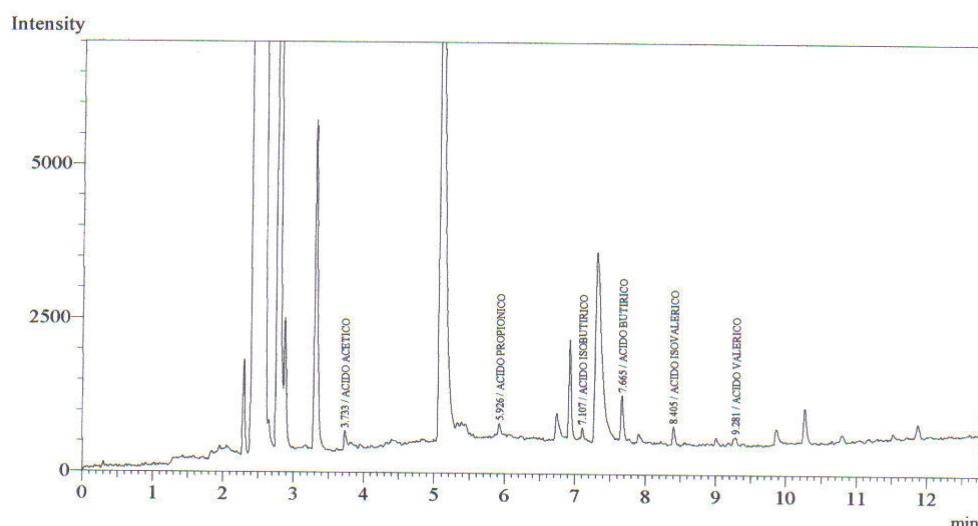
Grafico 6. Comportamiento de cada ácido volátil en el fermentador R-311 durante el tiempo de desarrollo del cultivo



Realizando el comparativo con la acidez volátil total (tabla 19), la acidez volátil determinada por cromatografía de gases es el 67% de la total, como se explicó en el numeral anterior por la presencia de otros ácidos que no se pueden determinar por Cromatografía de Gases y que si afectan la acidez.

6.2.4.3 Fermentador R-312 En la figura 37 se muestra un cromatograma de una muestra tomada al fermentador R-312 y en donde se visualiza los seis ácidos volátiles. Aquí ya se detecta el ácido propiónico en bajas concentraciones, con la presencia de éste ácido se puede decir que en este fermentador existe una población microbiana diferente a la que se encuentra en el fermentador R-311, se han generado otros tipos de bacterias que en su metabolismo producen ácido propiónico. En la tabla 20 se encuentran las concentraciones de cada ácido comparada con la de acidez volátil titulable.

Figura 37. Cromatograma de una muestra en estudio del fermentador R-312



En este fermentador se observa una concentración mayor de ácidos volátiles, el acético, propiónico e isobutírico se incrementaron las bacterias que venían del fermentador R-311 seguían allí y quizás muchas más, al contrario el butírico e isovalérico disminuyeron, posiblemente las bacterias que estaban presentes en este tanque lo producían en menor cantidad y como el proceso es continuo entra y sale mosto fermentado la concentración de estos dos ácidos disminuyó. Además éste tanque recibe menor cantidad de materia prima y vinaza en comparación con el R-311.

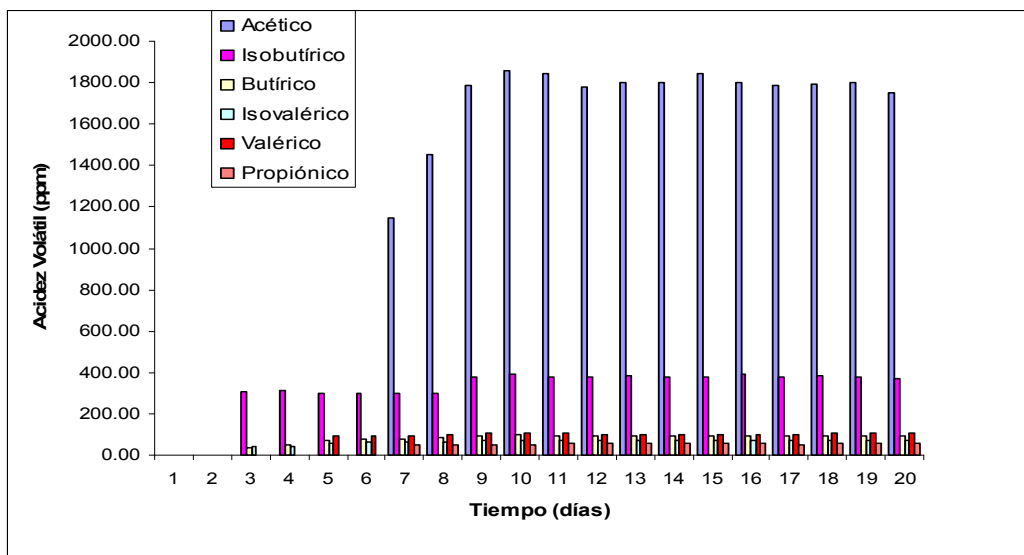
Realizando el comparativo con la acidez volátil titulable, con éste análisis cromatográfico en este tanque se pudo determinar el 71% del total de la acidez.

Tabla 20. Concentración de cada ácido volátil en el fermentador R-312

Tiempo (Días)	Acético (ppm)	Propiónico (ppm)	Isobutírico (ppm)	Butírico (ppm)	Isovalérico (ppm)	Valérico (ppm)	Σ AV x CG (ppm)	AVT (ppm)	% AV x CG
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	306.41	35.12	40.13	ND	381.66	305.19	125.1
4	ND	ND	316.09	49.27	42.55	ND	407.91	310.29	131.5
5	ND	ND	298.32	72.58	57.78	93.52	522.20	356.65	146.4
6	ND	ND	297.80	79.75	61.51	90.55	529.61	379.33	91.4
7	1142.54	52.63	301.42	81.56	63.24	91.25	1732.64	2265.85	76.5
8	1452.36	50.18	302.45	83.47	65.23	96.45	2050.14	3728.81	55.0
9	1789.46	52.69	378.41	90.25	70.49	104.23	2485.53	4963.03	50.1
10	1856.12	52.79	389.56	96.13	73.41	106.79	2574.80	5330.66	48.3
11	1845.32	53.78	380.49	95.47	73.42	103.78	2552.26	4893.56	52.2
12	1778.96	57.46	380.41	93.66	70.44	98.83	2479.76	4293.85	57.8
13	1802.44	59.12	382.45	94.78	72.11	100.49	2511.39	4997.00	50.3
14	1800.14	55.23	379.55	93.78	71.64	99.23	2499.57	4523.15	55.3
15	1845.00	56.41	380.46	94.25	72.05	103.20	2551.37	4612.30	55.3
16	1799.14	54.96	388.66	92.41	71.89	101.25	2508.31	4378.96	57.3
17	1785.42	53.14	380.46	90.87	73.46	100.88	2484.23	4213.58	59.0
18	1790.63	54.66	385.71	91.58	72.48	104.69	2499.75	4412.57	56.7
19	1798.56	54.87	374.00	93.46	74.28	106.48	2501.65	4432.56	56.4
20	1752.32	53.46	368.94	93.48	73.45	104.29	2445.94	4215.89	58.0
X	1731.3	54.4	355.1	84.5	66.6	100.4	1984.4	3489.6	71

ND: No Detectable

Grafico 7. Comportamiento de cada ácido volátil en el fermentador R-312 durante el tiempo de desarrollo del cultivo

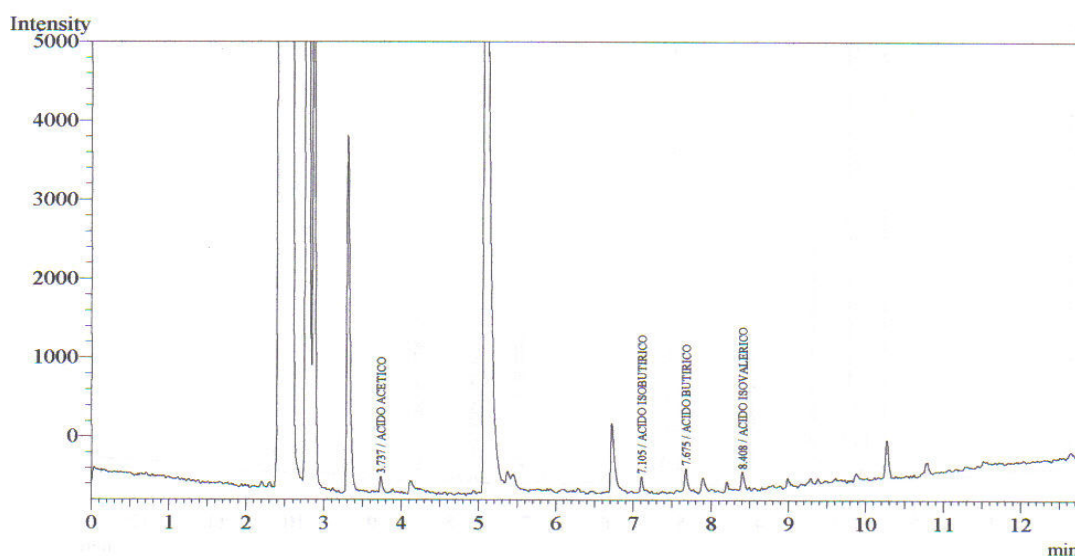


En el gráfico 7 se ilustra el comportamiento de cada ácido durante el tiempo de cultivo. Cada 24 horas se tomaba una muestra y se analizaba cromatográficamente. El día 7 se empieza a detectar el ácido acético y el día 10 tiene su máxima concentración, de allí en adelante se puede decir que la concentración del ácido acético se mantiene constante. A partir del día 7 se

observa la presencia de los seis ácidos volátiles en estudio. Los ácidos isobutírico, butírico e isovalérico se presentan todo el tiempo del cultivo, el isobutírico en mayor concentración que los otros dos. El ácido acético sigue siendo el principal y lo sigue el isobutírico.

6.2.4.4 Tanque de Activación de Levadura R-305 De igual manera se estudió el comportamiento de los ácidos volátiles en el tanque de activación de levadura dando resultados muy similares a los del fermentador R-311 en donde no se detecta el ácido propiónico. En la figura 38 se visualiza un cromatograma de una de las muestras problemas (Día sexto) en donde se identifican cuatro de los ácidos en estudio y otros componentes desconocidos que se producen en el proceso de fermentación aeróbica. La investigación de estos componentes incógnitas queda como continuación de este trabajo. En los tiempos de retención de 3.4 y 5.1 min aproximadamente se tienen dos compuestos desconocidos que sería muy interesante saber de que sustancias se tratan. Los dos primeros picos corresponden al diclorometano.

Figura 38. Cromatograma de una muestra en estudio del tanque R-305



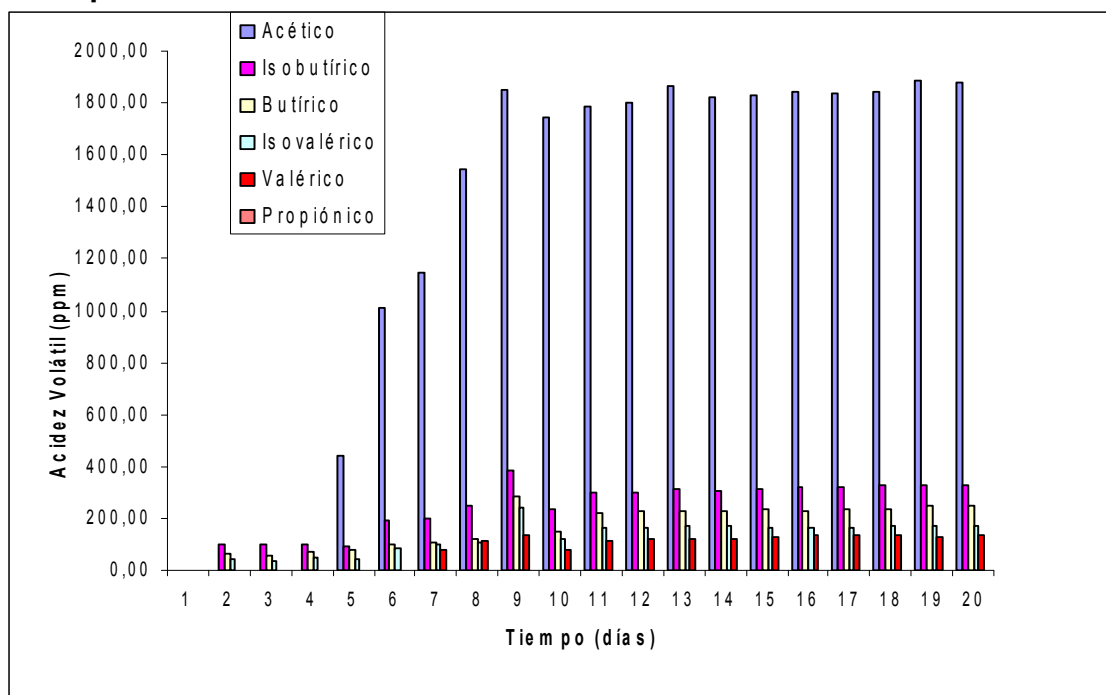
En la tabla 21 se observan cada una de las concentraciones en ppm de los ácidos encontrados en el tanque de activación de levadura y se realiza un comparativo con la acidez volátil titulable dando como resultado que por cromatografía de gases se determina el 68% de la acidez total de la muestra. Los demás componentes que influyen en este parámetro se deben determinar por otro método, uno de estos métodos puede ser cromatografía líquida.

Tabla 21. Concentración de cada ácido volátil en el tanque R-305

Tiempo (Días)	Acético (ppm)	Isobutírico (ppm)	Butírico (ppm)	Isovalérico (ppm)	Valérico (ppm)	Σ AV x CG (ppm)	AVT (ppm)	% AV x CG
2	ND	96,74	65,41	40,21	ND	202	267,26	75,7
3	ND	98,42	60,41	38,47	ND	197	221,57	89,0
4	ND	102,38	70,30	52,22	ND	224	303,64	74,1
5	442,85	92,41	75,23	43,48	ND	653	570,68	114,6
6	1012,45	192,31	99,20	83,94	ND	1387	1722,45	80,6
7	1145,87	201,65	104,56	97,66	79,44	1629	2978,25	54,7
8	1541,22	250,41	120,65	110,32	115,48	2138	3092,32	69,1
9	1847,12	384,31	284,65	243,96	132,88	2892	4692,06	61,7
10	1745,68	231,69	152,12	120,11	81,20	2330	4343,77	53,7
11	1789,25	301,46	220,13	160,47	114,56	2585	4030,04	64,2
12	1800,14	299,45	231,21	165,74	120,66	2617	4136,59	63,3
13	1865,32	312,46	230,41	170,42	118,47	2697	4523,15	59,6
14	1825,44	305,48	224,63	169,33	122,78	2647	4289,47	61,7
15	1832,63	312,55	236,45	163,79	130,47	2675	4347,23	61,6
16	1844,69	320,13	229,22	165,84	135,42	2695	4412,57	61,1
17	1839,23	319,63	231,46	166,45	133,11	2689	4315,98	62,3
18	1842,99	325,68	233,13	169,47	132,39	2703	4332,14	62,4
19	1887,66	330,44	245,88	170,62	131,53	2766	4526,35	61,1
20	1879,31	329,13	250,47	173,48	136,98	2769	4478,55	61,8
X	1633,9	253,0	177,1	131,9	120,4	2026,6	3241,3	68,0

ND: No Detectable

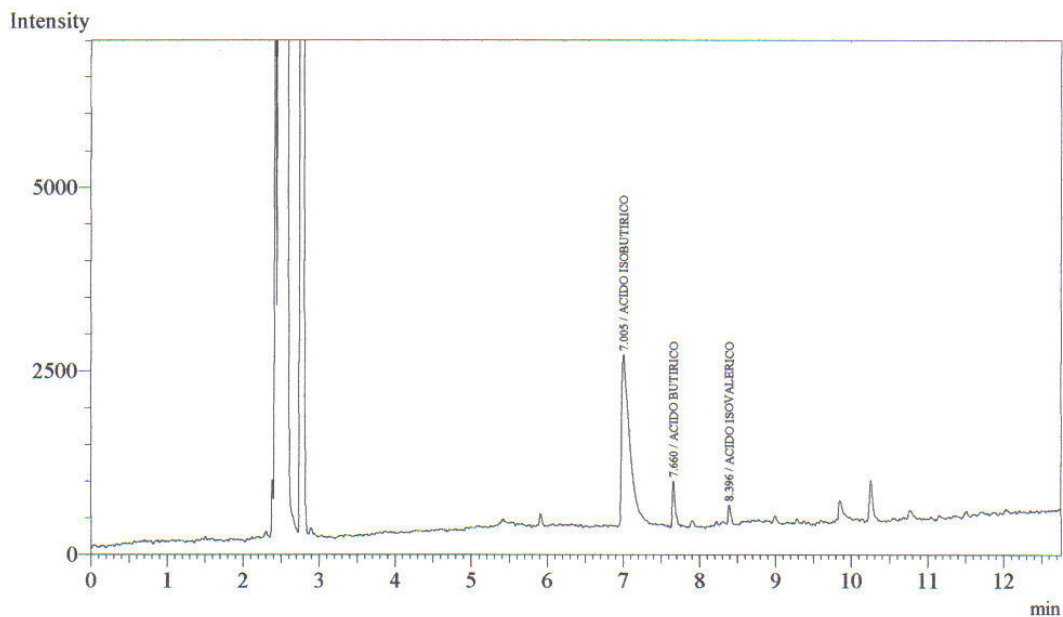
Gráfico 8. Comportamiento de cada ácido volátil en el tanque R-305 durante el tiempo de desarrollo del cultivo



En el gráfico 8 se refleja el comportamiento de cada ácido, la tendencia que tuvo durante el desarrollo y como en todos los tanque el ácido acético es el que predomina luego lo sigue el ácido isobutírico, butírico, isovalérico y por último el valérico. El ácido propiónico no se detecta en este tanque.

6.2.4.5 Vinaza Recirculada T-403 En la figura 39 se visualiza un cromatograma de una muestra en estudio de la vinaza recirculada al proceso de fermentación en él se puede identificar los primeros picos que corresponden al diclorometano y solo tres de los ácidos en estudio como es el isobutírico, butírico e isovalérico. Los demás ácidos se eliminan por el choque térmico que tienen en el tanque flash. Un procedimiento similar a éste se le debe hacer a la materia prima antes de entrar a fermentación para eliminar una gran cantidad de ácidos orgánicos que interfieren en el proceso.

Figura 39. Cromatograma de una muestra en estudio de la vinaza recirculada



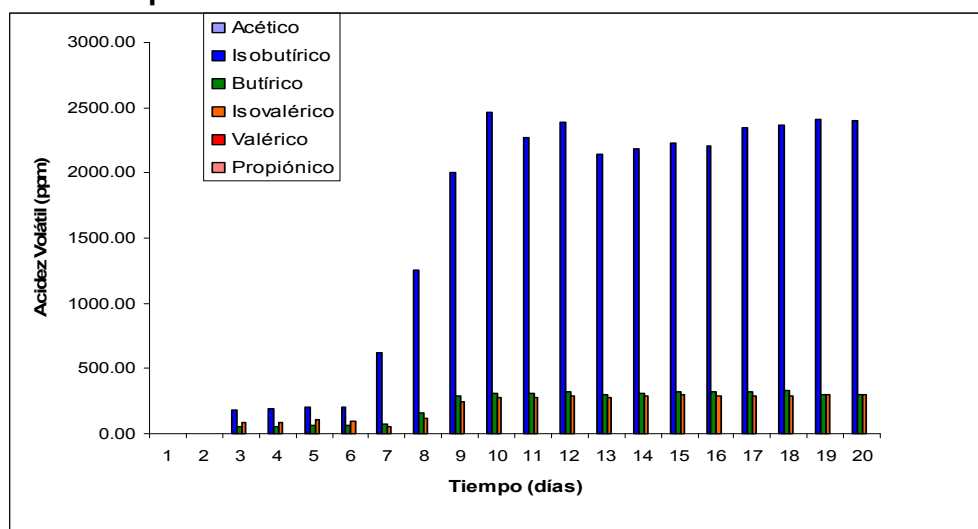
Debido a las altas temperaturas que maneja este tanque los ácidos más volátiles se evaporan, como son el acético, propiónico y valérico y los tres que quedan se concentran mucho más; con las concentraciones que se registran en la tabla 22 se puede analizar más detenidamente éste punto comparándolo con los demás tanques. Además la acidez volátil total también aumenta comparándola con la acidez del fermentador R-312 que en forma indirecta es la entrada a la columna mostera.

Tabla 22. Concentración de cada ácido volátil en la vinaza recirculada del tanque T-403

Tiempo (Días)	Isobutírico (ppm)	Butírico (ppm)	Isovalérico (ppm)	Σ AV x CG (ppm)	AVT (ppm)	% AV x CG
3	180.32	50.23	81.42	311.97	356.78	87.4
4	189.46	50.47	89.46	329.39	398.47	82.7
5	200.94	65.48	103.45	369.87	437.80	84.5
6	205.03	67.43	98.68	371.14	475.30	78.1
7	620.83	79.09	57.68	757.60	969.50	78.1
8	1256.42	160.48	120.22	1537.12	2884.60	53.3
9	1998.66	286.32	246.49	2531.47	5318.63	47.6
10	2465.98	315.88	283.02	3064.88	6531.21	46.9
11	2276.35	312.95	280.96	2870.26	5646.59	50.8
12	2385.13	319.46	291.78	2996.37	6220.85	48.2
13	2146.78	305.16	279.46	2731.40	5294.50	51.6
14	2185.64	313.23	286.44	2785.31	5563.42	50.1
15	2231.08	324.79	296.15	2852.02	5742.95	49.7
16	2204.62	322.32	285.55	2812.49	5641.32	49.9
17	2346.98	325.48	290.03	2962.49	5749.89	51.5
18	2367.59	330.01	292.13	2989.73	5896.43	50.7
19	2413.02	298.78	295.64	3007.44	5903.02	50.9
20	2400.05	300.46	304.96	3005.47	5841.30	51.5
X	1670.8	234.9	221.3	2127.0	4159.6	59.1

Analizando el porcentaje de ácidos volátiles determinados por Cromatografía de Gases con relación a la acidez total éste es menor que el de los demás tanques en un 59%, este hecho posiblemente es debido a que los otros ácidos que no se pueden determinar por ésta técnica y se concentran mucho más afectando en mayor grado la AVT.

Gráfico 9. Comportamiento de cada ácido volátil en la vinaza recirculada durante el tiempo de desarrollo del cultivo



En el gráfico 9 se visualiza más claramente la tendencia de cada ácido con el transcurso del tiempo. El ácido isobutírico es el que predomina en este caso, lo sigue el butírico y por último el isovalérico. Los otros tres ácidos en estudio no se detectan.

6.2.5 Análisis Microbiológicos A cada uno de los puntos de muestreo se les realizó recuento en placa tanto para bacterias mesófilas como para lácticas. La muestra fue puntual y tomada como se indica en el numeral 4.3.2 y analizada inmediatamente llevada al laboratorio.

Las bacterias en mosto fermentado son selectivamente cultivadas con la adición de Actidione (ciclohexamida) que inhibe el crecimiento de las células de levadura. El conteo de bacterias es determinado por cultivo sobre agar Plate Count solidificado en placa, de una cantidad determinada de diluciones de mosto fermentado (preparadas con agua destilada). En una incubación adecuada de la placa, las células de bacterias sobre la placa generan la formación de colonias y las células son expresadas como unidades formadoras de colonia UFC. Cada colonia representa una célula de bacteria individual. El conteo total de bacterias en el mosto fermentado está representado por el número total de colonias multiplicado por el factor de dilución. (6)

Las bacterias ácido lácticas se presentan naturalmente en las materias primas y mosto fermentado que entran y están en el proceso de fermentación. Las condiciones del medio durante la fermentación son ideales para el crecimiento y multiplicación de estas bacterias. Su presencia causa pérdidas de azúcares y formación de ácidos. Esto afecta la eficiencia total y los rendimientos. (6)

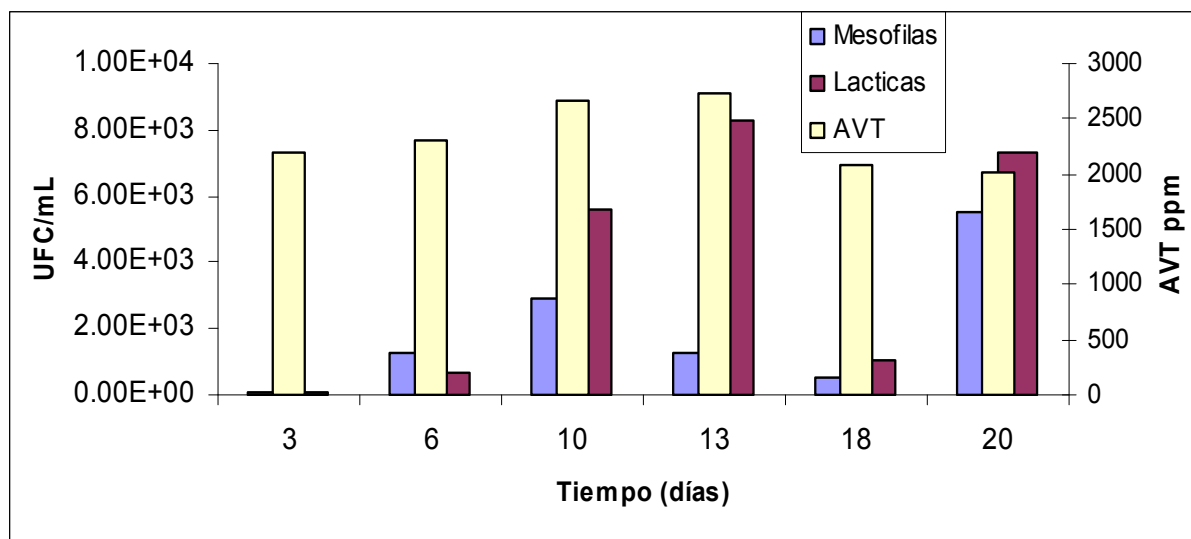
Sin embargo, un medio selectivo llamado Lactobacillus MRS es usado para el cultivo y aislamiento del lactobacilo. El medio de cultivo MRS contiene polisorbato, acetato, magnesio y manganeso, los cuales se sabe que actúan como factores especiales para el crecimiento del lactobacilo, también como una rica base nutricional.

Con el fin de conocer que relación se tiene entre la acidez volátil total y el recuento en placa para mesófilas y lácticas se realizó un seguimiento a cada tanque en estudio y se comparó con la acidez volátil titulable y los resultados se reflejan en los siguientes gráficos. En la tabla 23 se presentan las UFC/mL de cada tanque durante el tiempo de desarrollo de cultivo.

Tabla 23. Recuento en placa de bacterias mesófilas y lácticas en el proceso de fermentación

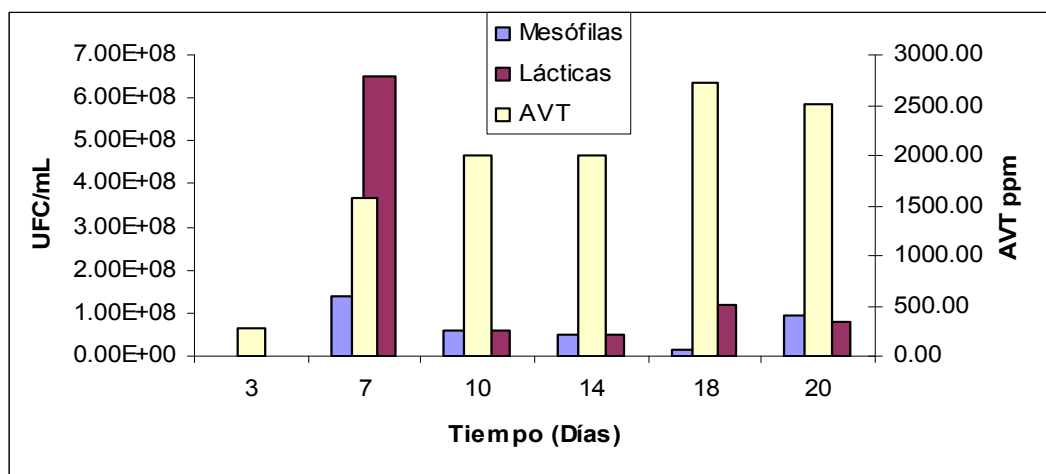
Tiempo (días)	T-124		R-305		R-311		R-312		Vinaza	
	Mesófilas	Lácticas	Mesófilas	Lácticas	Mesófilas	Lácticas	Mesófilas	Lácticas	Mesófilas	Lácticas
3	8.00E+01	8.00E+01	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+02	1.00E+02
6	1.28E+03	6.80E+02	1.40E+08	6.50E+08	3.00E+08	9.90E+06	1.01E+09	4.12E+09	8.00E+02	8.00E+02
10	2.88E+03	5.60E+03	5.80E+07	6.10E+07	1.13E+08	1.20E+08	1.42E+09	2.84E+09	1.04E+04	3.70E+03
13	1.30E+03	8.30E+03	4.90E+07	4.80E+07	4.30E+07	3.80E+07	3.70E+08	7.70E+08	3.00E+04	3.00E+04
18	4.90E+02	1.01E+03	1.47E+07	1.17E+08	3.70E+07	1.44E+08	4.30E+08	9.60E+08	8.00E+04	8.00E+04
20	5.50E+03	7.30E+03	9.40E+07	7.80E+07	1.20E+08	8.10E+07	5.60E+08	7.88E+08	6.20E+03	4.00E+03

Gráfico 10. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en la materia prima (T-124)



En general la contaminación bacteriana de mesofilas y lácticas en la materia prima es baja comparada con los demás tanques en estudio. En el tercer día existe una acidez total pero se tiene una baja población de mesófilas y lácticas, ésta acidez posiblemente es desarrollada por bacterias gram negativas que no son determinadas en esta investigación y que puede estar en el medio produciendo ácidos orgánicos. Los días siguientes estas bacterias se presentan en mayor proporción haciendo que la acidez volátil total aumente.

Gráfico 11. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en el tanque de activación de levadura (R-305)



Como se pudo ver en el numera 5.2.2.2 a medida que transcurre el tiempo la acidez volátil aumenta pero en los recuentos solo se ve que aumenta considerablemente el séptimo día, los demás días disminuyen aunque la AVT sigue aumentando entonces se podría decir que en el medio existen otros tipos de bacterias (Gram negativas) que producen ácidos orgánicos que no son determinadas por ésta técnica.

Gráfico 12. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en el fermentador R-311

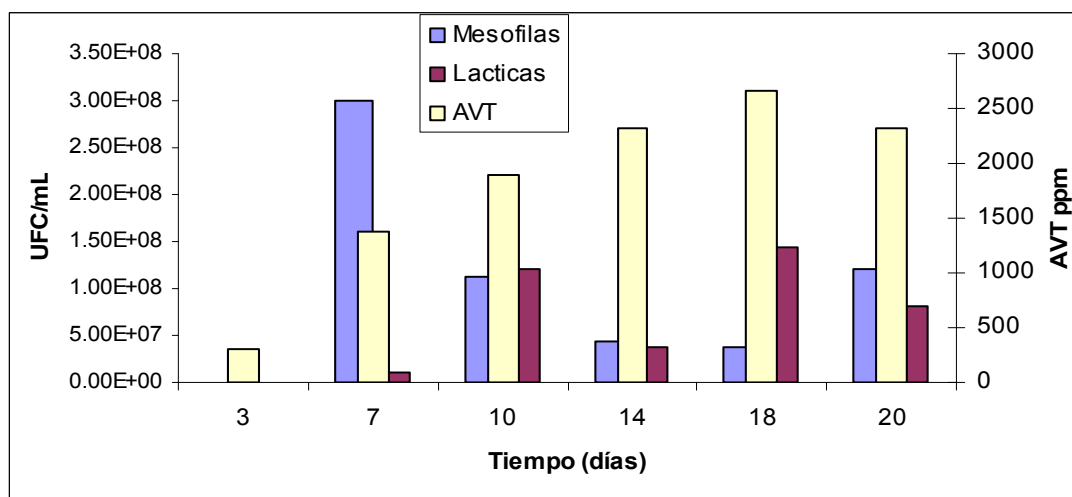
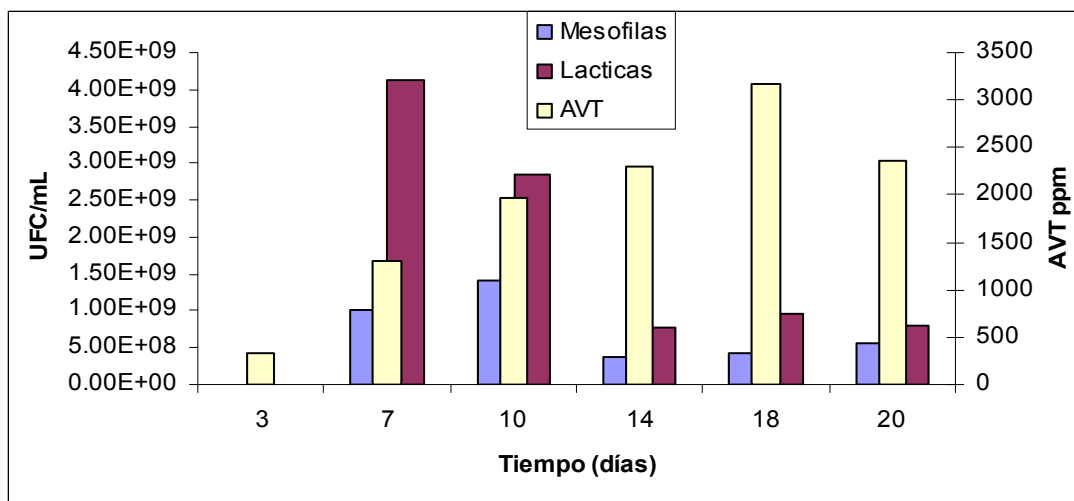
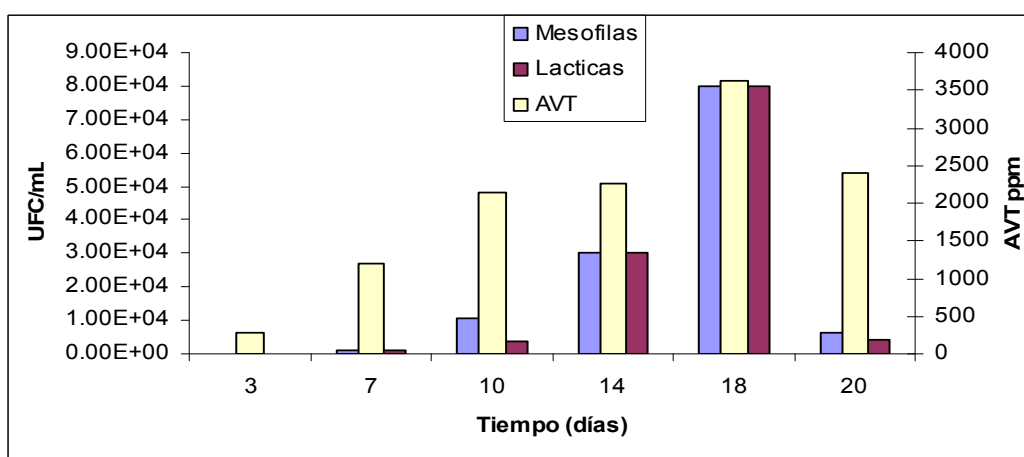


Gráfico 13. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en el fermentador R-312



En los dos fermentadores se tiene resultados similares a los obtenidos en el tanque de activación de levadura donde a pesar del aumento de la acidez volátil con el tiempo el recuento es inconstante unos días aumenta y otros disminuye. Esto es debido a que en el proceso utilizan antibióticos para contrarrestar la contaminación eliminando algunas bacterias de medio pero los ácidos no disminuyen se acumulan día a día.

Gráfico 14. Recuento en placa de mesófilas y lácticas con respecto a la acidez volátil total en la vinaza recirculada (T-403)



En la vinaza recirculada el recuento es menor que en los dos fermentadores y el tanque de activación de levadura pero un poco más alta que el de la materia prima. En la gráfica 14 se observa una relación directa entre el recuento de mesófilas y lácticas con la acidez volátil total con el transcurso del tiempo. Al aumentar el recuento aumenta la acidez volátil. El día 20 el recuento disminuye por el efecto del antibiótico y por ende la AVT.

Debido a que la vinaza pasa por un proceso térmico la contaminación microbiana disminuye con respecto a la que sale del fermentador R-312 pero en el retorno hacia fermentación por contacto con la tubería, intercambiador y demás nuevamente se crea contaminación bacteriana que debe ser controlada para que no afecte el proceso de fermentación.

7. CONCLUSIONES

- ♦ La Acidez Volátil en el proceso de fermentación de la planta de alcohol del ingenio Risaralda S.A. depende significativamente del proceso de producción de azúcar, del control que se le realice al material de alimentación. En el momento no hay un control estricto que garantice la baja contaminación y concentración de ácidos orgánicos. En caso de algún problema en la fábrica de azúcar por contaminación el proceso fermentativo de inmediato se ve afectado. Así que es muy importante tener un tratamiento previo a la materia prima que va hacia fermentación para mejorar las condiciones iniciales.
- ♦ Con el transcurso de tiempo la acidez volátil en los fermentadores, en el tanque de activación de levadura y en la vinaza recirculada aumenta exponencialmente, cuando en los fermentadores sobrepasa las 3000 ppm la levadura *Sacharomyces cereveciae* se inactiva y la producción de alcohol empieza a decaer, el rendimiento de la planta disminuye.
- ♦ El ácido que se encuentra en mayor concentración en el proceso de fermentación es el acético, con excepción de la vinaza recirculada que por el efecto del calentamiento que tiene en el proceso de destilación se eliminan varios ácidos como es el acético y propiónico pero se concentran los de alto peso molecular como son el isobutírico, butírico e isovalérico.
- ♦ El ácido propiónico es el que se produce en menor cantidad en el proceso de fermentación, sólo se detectó en el fermentador R-312 y con concentraciones bajas, alrededor de 54.4ppm.
- ♦ La presencia de los ácidos volátiles se observa desde el primer día del cultivo, y con el transcurso del tiempo su concentración se acumula; en ningún momento la presencia individual de alguno de los ácidos en particular afecta la levadura, si no que el efecto se ve cuando la concentración total aumenta por encima de 3500ppm.
- ♦ La relación que existe entre el recuento en placa y la acidez volátil total no es directa, en ocasiones las responsables del aumento de la acidez volátil son bacterias gram negativas y con el recuento en placa que se desarrolló en éste trabajo solo se observó gram positivas.

8. RECOMENDACIONES

- ♦ Una alternativa para mejorar las condiciones iniciales de la materia prima que va hacia fermentación es diseñar un sistema de calentamiento donde la mezcla miel y jugo que viene de fábrica de azúcar tenga un choque térmico, un flascheo, para que los ácidos orgánicos y las bacterias presentes disminuyan y se eliminen respectivamente. Para esto se necesitaría un tanque, calderín y un intercambiador de calor y así evitar que la materia prima llegue con temperaturas elevadas a los fermentadores y afecte a la levadura.
- ♦ Es importante llevar un control más estricto, continuo y con mayor frecuencia a la materia prima antes de entrar al área de fermentación para evitar que ingrese material de mala calidad y pueda afectar gravemente el proceso de producción de alcohol.
- ♦ La limpieza, sanitización y desinfección adecuada de la planta de producción de alcohol mediante el uso de detergentes, desinfectantes y agentes antimicrobianos, es un aspecto fundamental para la eliminación de contaminantes bacterianos.
- ♦ Continuar la cuantificación de ácidos volátiles por técnicas instrumentales confiables como la cromatografía líquida, con el fin de determinar la concentración de ácidos láctico, málico y succínico y otros que por cromatografía de gases no se pueden determinar por las altas temperaturas que ésta técnica maneja. Con estos resultados se podría establecer la relación que existe entre la concentración del ácido láctico y el recuento en placa de bacterias lácticas.
- ♦ Establecer la relación entre la acidez volátil que se está generando por contaminación bacteriana y el recuento en placa por medio de un cálculo, fórmula o balance que permita cuantificar la cantidad de ácidos producidos en un sistema de fermentación continuo y con recirculación de vinaza.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. ACEVEDO, Astrid et al. Producción de alcohol carburante: Informe Técnico. 2005. 101p.
2. BOGAARD, Anthony; HAZEN, Mathew y BOVEN Cees. Quantitative Gas Chromatographic Analysis of Volatile Fatty Acids in Spent Culture Media and Body Fluids. Journal of Clinical Microbiology. Mar. 1986. p. 523-530.
3. CANO, Carlos G. y ALVAREZ Pablo A. Estudio del impacto de la acidez volátil generada por la adición de vinaza en tres mezclas de materia prima y su efecto sobre el rendimiento en la producción de alcohol en el ingenio Incauca s.a. Palmira, 2005, 60p. Trabajo de Grado (Ingeniería Agroindustrial). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Administración. 2005.
4. CHEN, James. Manual del azúcar de caña. Editorial Limusa S.A. México. Capítulo XV. 2000. p. 545 -564.
5. GALLO. Contaminantes bacterianos en la fermentación alcohólica. Editorial Acribia. 1991. p. 12-27.
6. INDUSTRIAS PRAJ. Analytical Methods for cane feedstock based fermentation and Distillation Process. Edition 4th. 2004. 205p
7. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS. Etanol anhidro combustible desnaturalizado obtenido a partir de biomasa, para mezclar con gasolinas motor, empleado como combustible en vehículos con

motores de combustión interna de encendido por chispa. Bogotá: ICONTEC, 2004. 12p. NTC 5308.

8. JORGENSEN, Alfred. Microbiología de las fermentaciones industriales. Editorial Acribia. 7 ed. Zaragoza. 1959. p. 30-57.
9. SUCROMILES S.A. La Destilería. En: SEMINARIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN SUCROMILES S.A. (1º: 2003: Palmira) Ponencias y conclusiones del seminario producción de alcohol, 2003. 15p.
10. OWEN, T. The Microbiology of sugars, syrups and molasses. L.A. 1949. 19p.
11. PRESCOTT, Samuel. Microbiología Industrial. Aguilar S.A. 2 ed. Madrid. 1952. p. 25-74.
12. VALENCIA, Isabel Cristina. Estudio del comportamiento microbiológico de mieles de caña en la fermentación alcohólica. Cali, 2004, 60p. Proyecto de investigación (Laboratorio de Microbiología). Universidad del Valle. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y laboratorio clínico. 2004.